

DIE ISOENZYME DER MALATDEHYDROGENASE VON ACETABULARIA

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
am Fachbereich Biologie (23)
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Ursula Rahmsdorf
aus Pitschen

Berlin 1975

1976

DIE ISOENZYME DER MALATDEHYDROGENASE VON ACETABULARIA

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
am Fachbereich Biologie (23)
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Ursula Rahmsdorf

aus Pitschen

Berlin 1975



Referent Prof. Dr. G. Werz

Referent Prof. Dr. H. G. Schweiger

Tag der mündlichen Prüfung 2.2.1976

Druck: Zentrale Universitätsdruckerei, V a A 4

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1. Einführung	6
1.2. Definition und Entstehung von Isoenzymen	7
1.3. Vorkommen von Isoenzymen	8
1.4. Intrazelluläre Verteilung der Isoenzyme der Malatdehydrogenase	10
1.5. Funktion der Isoenzyme der Malatdehydrogenase in der Zelle	10
1.6. Veränderungen der Isoenzymmuster in Abhängigkeit von Entwicklung und physiologischem Zustand	15
1.7. Malatdehydrogenase in Acetabularia	17
2. Material und Methoden	21
2.1. Aufzucht der Pflanzen	21
2.2. Isolierung von Chloroplasten und Mitochondrien	22
2.3. Trennung der Organellen	22
2.3.1. differentielle Zentrifugation	22
2.3.2. Saccharosedichtegradienten- zentrifugation	22
2.4. Enzymnachweise	23
2.4.1. NADH abhängige Malatdehydrogenase	23
2.4.2. NADPH abhängige Malatdehydrogenase	24
2.4.3. Cytochromoxydase	25
2.5. Elektrophoretische Auftrennung der Isoenzyme der Malatdehydrogenase	25

2.6. Chlorophyllbestimmung	26
2.7. Proteinbestimmung	26
2.8. Anreicherung und partielle Reinigung	
der Malatdehydrogenase	27
2.8.1. Homogenisation der Zellen	27
2.8.2. Behandlung in der 'Yeda Press'	27
2.8.3. Ammoniumsulfatfällung und Dialyse	27
2.8.4. DEAE-Cellulose Chromatographie	28
2.9. Molekulargewichtsbestimmung	28
2.10. Chemikalien	29
3. Ergebnisse	30
3.1. Die Isoenzyme der NADH abhängigen Malat-	
dehydrogenase in Acetabularia	
mediterranea	30
3.2. Kompartimentierung der Malatdehydrogenase	
in Acetabularia mediterranea	31
3.2.1. Charakterisierung der Zell-	
fraktionen	31
3.2.2. Trennung der Zellfraktionen durch	
differentielle Zentrifugation und	
Charakterisierung der Malat-	
dehydrogenase in diesen Fraktionen	31
3.2.3. Trennung der Zellfraktionen durch	
Saccharosedichtegradientenzentri-	
fugation und Charakterisierung	
der Malatdehydrogenase	36
3.3. Präparative Trennung der Isoenzyme der	
Malatdehydrogenase von Acetabularia	
mediterranea	41

3.4. Eigenschaften der Isoenzyme der Malatdehydrogenase	48
3.4.1. Stabilität	48
3.4.2. pH-Optimum	50
3.4.3. Temperaturabhängigkeit	50
3.4.4. Abhängigkeit der Malatdehydrogenaseaktivität von der Oxalacetatkonzentration	52
3.4.5. Molekulargewicht	53
3.5. Charakterisierung der Malatdehydrogenase unter unterschiedlichen physiologischen Zuständen der <i>Acetabularia mediterranea</i> -Zellen	54
3.5.1. NADH abhängige Malatdehydrogenase in der Entwicklung von <i>Acetabularia mediterranea</i>	55
3.5.2. NADH abhängige Malatdehydrogenase in kernhaltigen und kernlosen Zellen von <i>Acetabularia mediterranea</i>	58
3.5.3. Der Einfluß des Lichts auf das Isoenzymmuster der Malatdehydrogenase	59
3.6. Kompartimentierung der Malatdehydrogenase bei <i>Acetabularia cliftonii</i>	63
4. Diskussion	74
4.1. NADPH abhängige Malatdehydrogenase	74

4.2. NADH abhängige Malatdehydrogenase	75
4.2.1. Die NADH abhängigen MDH-Isoenzyme in nichtfraktionierten Zell- homogenaten	75
4.2.2. Fraktionierung der Zellhomogenate von Acetabularia	77
4.2.3. Lokalisation der Malatdehydrogenase	83
4.2.4. Eigenschaften, Determination und Funktion der Malatdehydrogenase- Isoenzyme	87
4.2.4.1. Eigenschaften	87
4.2.4.2. Determination	93
4.2.4.3. Funktion	94
4.2.5. Die Isoenzyme der Malatdehydroge- nase in der Entwicklung und unter unterschiedlichen physiologischen Bedingungen	95
4.3. Offene Fragen	99
5. Zusammenfassung	101
6. Literatur	104
7. Verzeichnis der Abkürzungen	119

1. Einleitung

1.1. Einführung

Im Zentrum des biologischen Interesses steht heute die Frage, welche Mechanismen die Differenzierung von Zellen und Organismen bewirken. Es ist aus zwei Gründen wichtig, verstehen zu lernen, welche Veränderungen die Makromoleküle einer Zelle während der Differenzierung zeigen und welche Differenzierungsprozesse dadurch ausgelöst werden.

1. Die Veränderung von Makromolekülen während der Entwicklung ist der biochemische Beweis für in der Zelle ablaufende Differenzierungsvorgänge. Ein Verständnis der auftretenden Veränderungen bringt uns der Erklärung der verantwortlichen Differenzierungsvorgänge näher.

2. Die Veränderung von Makromolekülen kann Differenzierung bewirken. Ein Verständnis der ablaufenden Vorgänge könnte zeigen, wie Differenzierung und Entwicklung gesteuert werden können.

Mit der morphologischen Differenzierung und Spezialisierung der Zellen ist eine fortwährende Synthese und / oder Degradation spezifischer Enzyme und Strukturproteine verbunden. Ein allgemeines Phänomen in der zellulären Entwicklung und Differenzierung ist die Fähigkeit der Zellen zu bestimmten festgelegten Zeiten spezifische biochemische Charakteristika zu erlangen und wieder zu verlieren. Dazu gehören auch quantitative und qualitative Veränderungen in der Enzymaktivität der Zellen. In einem sich entwickelnden Organismus

kann eine Synthese neuer Enzyme oder eine Vermehrung bereits vorhandener Enzyme stattfinden. Der exakte Mechanismus, der die Regulation von Enzymaktivitäten in den Zellen vielzelliger Organismen während der Entwicklung steuert, ist noch unbekannt.

Ein Modell für Differenzierung in Raum und Zeit ist das Vorkommen von Isoenzymen in einer Zelle. Es ist in einer Reihe von Organismen gezeigt worden, daß in unterschiedlichen Organellen einer Zelle unterschiedliche Enzyme vorkommen, die die gleichen oder ähnliche Reaktionen katalysieren und daß sich ihr Isoenzymmuster während der Entwicklung ändern kann. Ein Verständnis dafür, wie und warum Isoenzyme in Zellen entstehen und wie und warum die Isoenzymzusammensetzung einer Zelle während der Entwicklung verändert wird, dürfte uns dem Vorgang der Differenzierung ganzer Zellen, Organe und Organismen näher bringen.

1.2. Definition und Entstehung von Isoenzymen

Diesen Überlegungen folgend hat es in den letzten Jahren eine große Anzahl von Untersuchungen über Isoenzyme gegeben. Der Begriff - Isoenzym - wurde von Markert und Möller (1959) eingeführt. Sie bezeichnen damit multiple Molekülformen eines Enzyms, die ähnliche oder identische Substratspezifität besitzen und in einem Organismus vorkommen. Man weiß heute, daß die Entstehung von Isoenzymen entweder genetisch bedingt sein kann (Longo und Scandalios 1969) oder auf chemisch physikalischen Verän-

derungen der fertigen Proteine beruhen kann. Ein genetischer Mechanismus zur Entstehung von Isoenzymen mag Gen-duplikation und darauf folgende Mutation in einem Gen sein (Longo und Scandalios 1969). Ist ein Enzym aus mehreren Untereinheiten aufgebaut, dann können durch unterschiedliche Kombination dieser Untereinheiten verschiedene Isoenzyme entstehen. Dies wurde besonders deutlich für die Lactatdehydrogenase-Isoenzyme gezeigt. Jedes Enzymmolekül besteht aus vier Untereinheiten, die zwei molekularen species a und b angehören. Durch Kombination der Moleküle a und b entstehen die Isoenzyme aaaa, aaab, abbb und bbbb (Kowalewski 1972). Die Bildung von Isoenzymen durch sekundäre Veränderungen der Enzyme, z. B. durch unterschiedliche Faltung der Proteinketten (Hotchkiss 1964) oder durch Bindung an unterschiedliche Coenzyme (Jacobsen 1968, Ursprung und Carlin 1968) ist ein anderer gut belegter Mechanismus zur Entstehung von Isoenzymen (Übersicht Scandalios 1974). Die Arbeit mit diesen Isoenzymen erfordert daher spezielle Methoden zur Vermeidung von Veränderungen des nativen Enzyms während der Präparation.

1.3. Vorkommen von Isoenzymen

Die Zahl der Berichte über Vorkommen und Verteilung von Isoenzymen in pflanzlichen und tierischen Organismen ist sowohl was die Organismen als auch was die Enzyme angeht, in den letzten Jahren unüberschaubar geworden.

Es sieht so aus, als ob das Vorkommen von Isoenzymen eher die Regel als die Ausnahme ist.

Dies macht einerseits den Überblick über das

Gebiet schwierig, zeigt aber andererseits die eminente Bedeutung des Vorkommens von Isoenzymen für Differenzierung und Entwicklung von Organismen. Da sich die vorliegende Arbeit mit der Analyse der Isoenzyme einer pflanzlichen Zelle beschäftigt, werden einige Untersuchungen, die an pflanzlichen Organismen vorgenommen wurden, geschildert. Das Auftreten von Isoenzymen ist in einer großen Zahl pflanzlicher Zellen beschrieben worden, von den einzelligen Grünalgen (*Acetabularia* (Reuter und Schweiger 1969, Keck 1960, Clauss 1962), *Euglena* (Davis und Merrett 1973), *Chlorella*, *Ochromonas* (Lit. Übersicht Scandalios 1974)) über die Pilze (*Neurospora*, *Phycomyces* (Sulebele und Silverstein 1969), *Physarum* (Teague und Henney 1973), *Schizophyllum* (Lit. Übersicht Scandalios 1974) bis zu den am höchsten entwickelten Pflanzen (Baumwolle, Blumenkohl, Erbsen, Mais, Spinat, Tabak, Weizen, Wassermelone (Lit. Übersicht Scandalios 1974, Hock 1973)). Die beschriebenen Enzyme umfassen so unterschiedliche Enzyme wie Alkoholdehydrogenase, saure Phosphatase, Glutamatdehydrogenase, Hexokinase, Lactatdehydrogenase, Malatdehydrogenase, Peroxidase, α -Amylase, Aspartataminotransferase.

In der vorliegenden Arbeit sollen nur die Isoenzyme der Malatdehydrogenase betrachtet werden, ein Isoenzymsystem, das in vielen pflanzlichen Organismen besonders intensiv untersucht worden ist, z.B. in *Acetabularia*, *Chlorella*, *Citrus*, *Citrullus*, *Euglena*, *Gossypium*, *Hordeum*, *Neurospora*, *Physarum*, *Schizophyllum*, *Spinacea*, *Triticum*, *Xanthium*, *Zea mays* und Tabaksuspensionskulturen (Lit. Übersicht Scandalios 1974).

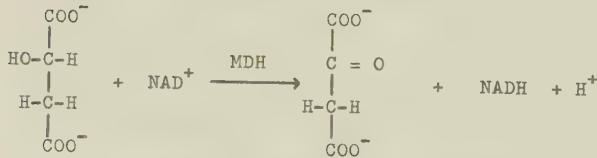
1.4. Intracelluläre Verteilung der Isoenzyme

Isoenzyme im engeren Sinne sind Enzyme gleicher Substratspezifität einer Zelle. In einer Reihe von Arbeiten wurde nachgesehen, wie sich die Isoenzyme einer Zelle auf die Zellorganellen verteilen. Isoenzyme der Malatdehydrogenase wurden bisher in drei Zellkompartimenten nachgewiesen. Eine Isoenzymfraktion ist mit dem löslichen Zellüberstand oder Cytosol assoziiert, eine andere Fraktion ist in den Mitochondrien lokalisiert und eine dritte Fraktion wurde den Microbodies der pflanzlichen Zelle zugeordnet. Berichte, daß Malatdehydrogenase mit den Chloroplasten der pflanzlichen Zelle assoziiert sein soll, sind bisher umstritten. Zum Teil wurden sie mit ungeeigneten Methoden zur Isolierung von Organellen erklärt (Yamazaki und Tolbert 1969, Rocha und Ting 1970). Auch Berichte über die Assoziation von Isoenzymen mit anderen Zellorganellen bedürfen weiterer Untersuchungen. Sie bieten jedoch ein interessantes System für Experimente über die Funktion dieser Enzyme in der Zelle und über die Kommunikation zwischen Zellorganellen an.

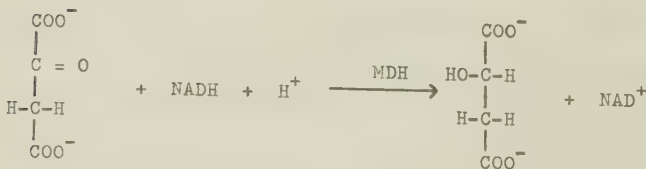
1.5. Funktion der Isoenzyme der Malatdehydrogenase in der Zelle

Das Malatdehydrogenase-Isoenzymssystem aus den Mitochondrien ist das am besten untersuchte Enzymsystem. In einer Reihe von Fällen kann angenommen werden, daß die Strukturgene für die mitochondriale Malatdehydrogenase im Kern der Zelle lokalisiert sind (Munkres et al. 1970). Dazu gehören Experimente, die zeigen, daß mitochondriale Isoenzymmuster nach Mendel vererbt werden und daß sich Dosiseffek-

te in triploidem Maisgewebe nachweisen lassen (Longo und Scandalios 1969). Versuche mit Antibiotika bei Mais (Yang und Scandalios 1974) und bei Neurospora (Benveniste und Munkres 1970) lassen vermuten, daß die mitochondrialen Isoenzyme an 80 s Ribosomen synthetisiert und erst dann in die Mitochondrien inkorporiert werden. Die mitochondriale Malatdehydrogenase ist im Citronensäurecyclus aktiv. Sie oxydiert hier unter Mitwirkung von NAD Malat zu Oxalacetat und regeneriert hiermit den Reaktionspartner des AcetylCoA.



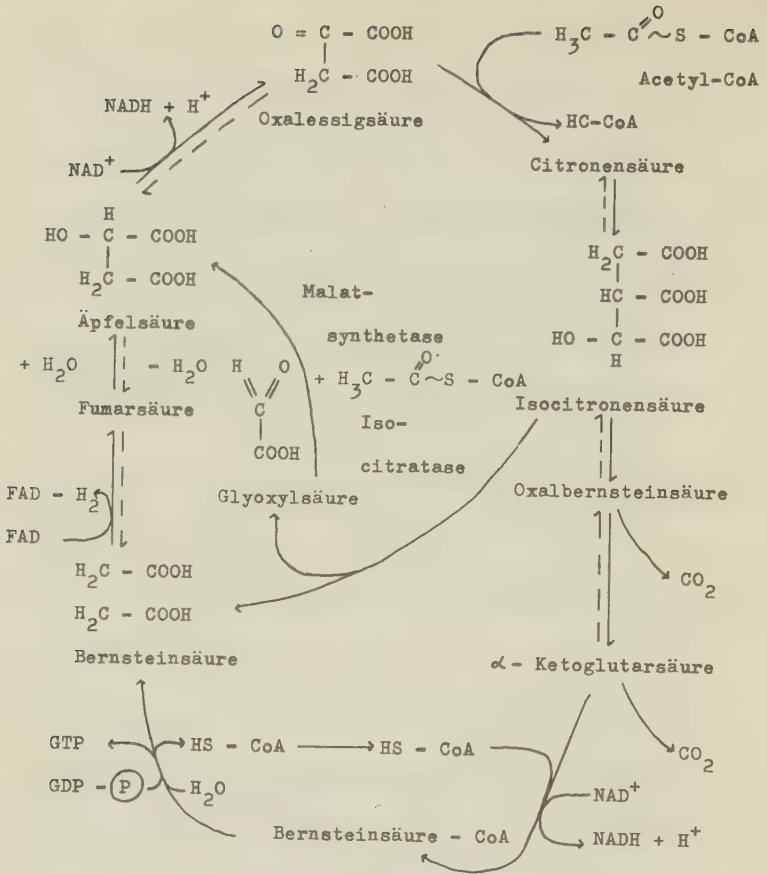
Die Malatdehydrogenase des Cytosols der pflanzlichen Zelle macht einen großen Teil der Gesamtaktivität in der Zelle aus und das Auftreten dieses Isoenzyms in diesem Zellkompartiment scheint ein allgemeines Phänomen zu sein. Die lösliche Malatdehydrogenase greift wahrscheinlich in die nichtautotrophe CO₂-Fixierung ein. Sie reduziert Oxalacetat, das bei der CO₂-Fixierung entsteht, zu Malat (Kaplan 1963, Mukerjii und Ting 1969, Rocha und Ting 1971).



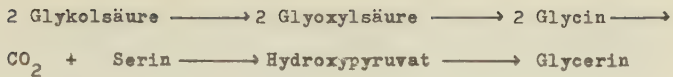
Am wenigsten fortgeschritten ist bis heute die Charakterisierung der Malatdehydrogenase der Microbodies bei Pflanzen. Zu den Microbodies gehören Peroxisomen und Glyoxysomen; sie werden unterschieden auf grund ihrer unterschiedlichen enzymatischen Zusammensetzung, Funktion und Verteilung auf verschiedene Gewebe bzw. ihres Erscheinens in verschiedenen Entwicklungszuständen der Zelle. In vielen Fällen, in denen bei pflanzlichen Organismen nur zwei Formen der Malatdehydrogenase gefunden werden, fehlt die Malatdehydrogenase der Microbodyfraktion.

Höhere Pflanzen und Mikroorganismen müssen in vielen Fällen Metabolite oder Fette mit 2 C Atomen in Kohlenhydrate oder andere Zellbestandteile umwandeln (Yang und Scandalios 1974, Weimberg 1968, Rocha und Ting 1970, Hock 1973). Dies trifft u. a. für Samen zu, die bei der Keimung Fette umbauen müssen, oder für Mikroorganismen, die auf Äthanol oder Acetat wachsen (Witt et al. 1966). Eine Schlüsselrolle bei diesen Vorgängen nimmt der Glyoxylsäurecyclus in den Glyoxysomen ein, in welchem AcetylCoA quantitativ in Succinat umgewandelt wird (Beever 1969). Die Aufgabe der Malatdehydrogenase dieser Zellfraktion ist die Reduktion von Malat zu Oxalacetat.

Die zweite größere Klasse der Microbodies, die Peroxisomen, kommt in photosynthetisch aktivem Gewebe höherer Pflanzen, den Blättern, vor. Die Peroxisomen enthalten fast alle Enzyme des Glykolsäurestoffwechsels, durch den vermutlich die während der Photosynthese produzierte Glykolsäure in Glycerinsäure umgewandelt wird (Tolbert et al. 1968, Tolbert 1971).



Die Reaktionen des Glyoxylsäurecyclus in Beziehung zum Citronensäurecyclus (Richter 1969)



Die Prozesse der Glycolatbiosynthese und des Glycolatstoffwechsels werden als Photorespiration bezeichnet. Die Malatdehydrogenase greift in diese Prozesse nicht direkt ein. Welche Rolle sie im Stoffwechsel dieser Organellfraktion spielt, ist noch ungeklärt. Einige Autoren (Yamazaki und Tolbert 1969, Kisaki und Tolbert 1969) vermuten eine Beteiligung der peroxisomalen Malatdehydrogenase in Spinatblättern an der Photorespiration. Da das Isoenzym aber auch in Wurzeln und etioliertem Gewebe, die keine Photorespiration besitzen (Rocha und Ting 1970, Yang und Scandalios 1974), vorkommt, scheint die peroxisomale Malatdehydrogenase nicht nur in diesen Prozeß einzugreifen.

Einige Autoren vermuten, daß die Malatdehydrogenase der verschiedenen Zellkompartimente an einem Transportmechanismus beteiligt ist, bei dem Wasserstoff und Coenzyme in die verschiedenen Organellen übertragen werden. Kaplan 1963 vermutet einen Cyclus in der Zelle, der Oxalacetat und Malat einschließt als einen "shuttle" zwischen löslichen und mitochondrialen Coenzymen. Das lösliche NADH wird durch Oxalacetat oxydiert. Das entstandene Malat wandert in die Mitochondrien und wird durch die mitochondriale Malatdehydrogenase und das mitochondriale NAD zu Oxalacetat oxydiert. Das Oxalacetat geht ins Cytoplasma und wird durch ein neues Molekül NADH reduziert. Das mitochondriale NADH könnte durch die Atmungskettenenzyme oxydiert werden und in Verbindung mit ATP stehen.

Schnarrenberger et al. (1971) postulieren, daß Malat und Aspartat in Sonnenblumen-Cotyledonen und Bohnen-Endosperm als Wasserstoffüberträger zwischen Microbodies und Chloroplasten oder Mitochondrien funktionieren. Die Malatdehydrogenase-Isoenzyme der verschiedenen Zellkompartimente würden dann je nach Bedarf die Umwandlung von Oxalacetat in Malat oder vice versa katalysieren. Einen ähnlichen Mechanismus schlagen Teague und Henney (1973) für die Funktion der cytoplasmatischen und mitochondrialen Isoenzyme der Malatdehydrogenase von *Physarum polycephalum* vor. Yang und Scandalios (1974) vermuten diese Funktion auch für die Malatdehydrogenase-Isoenzyme in Mais.

Das Vorkommen der NADH abhängigen Malatdehydrogenase in den Chloroplasten ist bis heute umstritten. Es wurde aber gezeigt, daß mit den Chloroplasten eine NADPH abhängige Malatdehydrogenase assoziiert ist (Mukerjee und Ting 1968, Hatch und Slack 1969, Rocha und Ting 1971, Ting und Rocha 1971 a, 1971 b, Ahmadi und Ting 1973). Sie scheint in den Chloroplasten in den Malatstoffwechsel einzugreifen. Malat tritt in einigen Algen und Pflanzen, in denen der Calvin-cyclus abläuft, als ein quantitativ geringes Photosyntheseprodukt auf und als ein Zwischenprodukt im C_4 -Dicarboxylsäurestoffwechsel der Photosynthese (Calvin und Bassham 1962, Hatch und Slack 1966).

1.5. Veränderungen der Isoenzymmuster in Abhängigkeit von Entwicklung und physiologischem Zustand

Es scheint, daß Malatdehydrogenase-Isoenzyme nur wenige qualitative Veränderungen während der Entwicklung pflanzlicher Organismen zeigen. Einige Veränderungen sind jedoch

festgestellt worden. Bei Xanthium-Blättern ändert sich das Isoenzymmuster der Malatdehydrogenase mit zunehmendem Alter der Blätter (Chen et al. 1970). Hock (1972, 1971) stellte fest, daß sich die Zahl der Isoenzyme der Malatdehydrogenase innerhalb von zwei Tagen während der Samenkeimung der Wassermelone von 10 auf 5 verringert. Die Gesamtaktivität der Malatdehydrogenase bleibt gleich. Die Isoenzymmuster sind auch vom physiologischen Zustand der Zellen abhängig. Bei Neurospora wird das lösliche Isoenzym bei der Zugabe von Glucose zum Medium unterdrückt (Benveniste und Munkres 1970) und bei Euglena wurde in Dunkelzellen eine 3 mal höhere Malatdehydrogenase-Aktivität im Cytosol festgestellt als in den Zellen, die im Licht wachsen (Peak et al. 1972).

Die Untersuchungen zeigen, daß in den meisten pflanzlichen Zellen die Malatdehydrogenase in einer Reihe multipler Enzymmoleküle vorkommt. Es konnte ferner gezeigt werden, daß die Isoenzyme der Malatdehydrogenase mit unterschiedlichen Zellorganellen assoziiert sind und daß sich die Isoenzymmuster während der Entwicklung pflanzlicher Organismen verändern können. Viele der bisher untersuchten Organismen zeigen eine Reihe von Nachteilen.

1. Pflanzliche Organe oder Gewebe sind aus unterschiedlichen Zelltypen aufgebaut. Unterschiede im Isoenzymmuster einzelner Organe können nicht einem Zelltyp zugeordnet werden.

2. Gleiches gilt, wenn Unterschiede im Isoenzymmuster,

die während der Entwicklung pflanzlicher Organismen auftreten, analysiert werden sollen.

3. Einzellige Organismen, in denen die Malatdehydrogenase untersucht worden ist, zeigen in vielen Fällen keine deutlichen Differenzierungsprozesse.

4. Bei der Analyse von Isoenzymen ist von entscheidender Bedeutung die Frage, von welchem Genom der Zelle die Isoenzyme codiert werden. Bei den beschriebenen Organismen konnte nicht oder nur sehr indirekt gezeigt werden, in welchen Organellen die Gene für die verschiedenen Isoenzyme einer Zelle liegen.

1.6. Malatdehydrogenase in Acetabularia

Bei der Grünalge *Acetabularia* handelt es sich um einen pflanzlichen Organismus, mit dem sich die eben geschilderten Probleme ausschließen lassen. *Acetabularia* ist eine Einzelzelle (Hämmerling 1931). Die Zelle zeigt einen Entwicklungszyklus und deutliche Differenzierungsvorgänge (Hämmerling 1934, Schulze 1939). Daher können Untersuchungen an selektionierten Zellen, d. h. an Zellen bestimmter Funktion und Gestalt, durchgeführt werden. Die *Acetabularia*-Zellen sind in der Regel mehrere cm lang und die Hutformen der einzelnen *Acetabularia*-Arten unterscheiden sich voneinander (Hämmerling 1931, 1932 a). Die Lokalisation des Kerns im Rhizoid erlaubt seine einfache sichere Entfernung (Hämmerling 1932 b). Diese Tatsache und die hohe Regenerationsfähigkeit der *Acetabularia*-Zelle erlauben einen Kern-Cytoplasma-Austausch (Hämmerling 1940, 1943, Beth 1943).

Keck (1960), Clauss (1962), Schweiger et al. (1967) und Reuter und Schweiger (1969) erkannten die Wichtigkeit der Tatsache, daß bestimmte Enzyme in *Acetabularia* in Form von Isoenzymen vorkommen und für die Lösung einer Reihe von zellbiologischen Problemen geeignet sind. Schweiger und Mitarbeiter (1967) zeigten, daß die Malatdehydrogenase in *Acetabularia* in Form unterschiedlicher Isoenzyme auftritt. Das Enzym hat in der Zelle eine relativ hohe Aktivität, ist leicht nachzuweisen und ist verhältnismäßig stabil. Die Enzymaktivität nimmt mit zunehmendem Gesamtproteingehalt zu. Aus der Tatsache, daß dies auch in kernlosen Zellen geschieht, läßt sich schließen, daß die mRNA für die Malatdehydrogenase in kernlosen Zellen stabil ist. Verschiedene *Acetabularia*-Arten unterscheiden sich in ihrem Isoenzymmuster (Schweiger et al. 1967, Sandakhchiev et al. 1973, Berger et al. 1974). Die Malatdehydrogenase-Isoenzyme von *Acetabularia mediterranea* (A. med) ließen sich in der Gelelektrophorese in zwei Isoenzymbanden, diejenigen von *Acetabularia cliftonii* (A. clift) in drei Isoenzymbanden auftrennen.

Schweiger und Mitarbeiter (1967) fanden, daß 95 % der Enzymaktivität mit der "Partikelfraktion" der *Acetabularia*-Zellen sedimentieren. Nur 5 % der Gesamtaktivität befinden sich im Überstand. Zwei Experimente lieferten Hinweise dafür, daß die Malatdehydrogenase der *Acetabularia*-Zelle in der Hauptsache mit den Chloroplasten assoziiert ist.

1. Durch histochemische Methoden ließ sich zeigen, daß die Malatdehydrogenase-Aktivität in *A. med* mit den Chloroplasten assoziiert ist.

2. In einem Dichtegradienten sedimentiert der größte Teil der Malatdehydrogenase mit den chlorophyllhaltigen Fraktionen.

Das Zusammentreffen der Befunde, die Artspezifität der Malatdehydrogenase-Isoenzymmuster in *Acetabularia*, die Assoziation der Malatdehydrogenase mit der Chloroplastenfraktion und schließlich die Möglichkeit Kerntransplantation zwischen einzelnen *Acetabularia*-Arten herzustellen, erlaubte die Beantwortung der Frage, wo die Gene für ein chloroplasten-assoziiertes Enzym lokalisiert sein könnten.

Die Experimente zeigen, daß die Isoenzyme von *Acetabularia* vom Kern determiniert werden und daß in Gegenwart eines artfremden Kerns die vor der Transplantation vorhandene mRNS der Malatdehydrogenase relativ schnell inaktiviert wird.

In der vorliegenden Arbeit soll die partikelgebundene Malatdehydrogenase von zwei *Acetabularia*-Arten, *A. med* und *A. clift*, näher charakterisiert werden.

Da sich aus verschiedenen Untersuchungen ergab (z. B. Bidwell et al. 1969), daß die Partikelfraktion nicht ausschließlich Chloroplasten enthält, sondern auch 'Cytoplasten', die recht verschiedene Organellanteile enthalten, wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, die darin enthaltenen Organellen voneinander zu trennen.

Es sollte geprüft werden, welche Organellen in der Par-

tikelfraktion enthalten sind, um entscheiden zu können, welchen Organellen die Malatdehydrogenase zugeordnet werden kann. Eine derartige Zuordnung der Malatdehydrogenase-Isoenzyme sollte es erlauben, die bereits beschriebenen Transplantationsexperimente neu zu analysieren und die Frage zu stellen, ob die Malatdehydrogenase-Isoenzyme, die eventuell den Mitochondrien zugeordnet werden können, vom Kerngenom oder von der Mitochondrien-DNS codiert werden. Die Malatdehydrogenase-Isoenzyme sollen präparativ getrennt werden und ihre biochemischen Eigenschaften untersucht werden. Derartige Untersuchungen sollten Aufschluß darüber geben, in welchem biochemischen Zusammenhang die Malatdehydrogenase-Isoenzyme der *Acetabularia*-Zelle stehen. Ferner können sie Hinweise für eine Funktion der Isoenzyme in den Organellen geben. Schließlich sollen die Malatdehydrogenase-Isoenzyme während des Entwicklungszyklus der Algen und unter unterschiedlichen physiologischen Bedingungen analysiert werden. Eine derartige Analyse sollte es erlauben, in einem nahezu einheitlichen Pflanzenmaterial mit deutlicher Differenzierung die Bedeutung dieser Isoenzymssysteme für die Entwicklung und Funktion dieser Algen zu prüfen.

2. Material und Methoden

2.1. Aufzucht der Pflanzen

Für die Versuche wurden mehrere Nachzuchten der Arten *Acetabularia mediterranea* und *Acetabularia cliftonii* verwendet. Die Zellen wurden in Erdschreiber-Medium aus Keimlingen im Licht-Dunkel-Wechsel (14 Stunden dunkel, 10 Stunden Licht) bei ca. 2400 Lux und 21°C gezogen (Hämmerling 1963, Schweiger 1969).

Kernlose Zellen wurden durch Abschneiden des kerntragenden Rhizoids hergestellt. Anschließend blieben die Pflanzen einen Tag unter Schwachlichtbedingungen zur Regeneration der Zellen. Die Weiterzucht erfolgte unter normalen Licht-Dunkel-Bedingungen. Nach 14 Tagen wurden die kernlosen Pflanzen parallel zu kernhaltigen Kontrollzellen aufgearbeitet.

Um den Einfluß des Lichtes auf das Isoenzymmuster der Malatdehydrogenase zu prüfen, wurden 20 mm lange Zellen von *Acetabularia mediterranea* verschiedenen Lichtbedingungen ausgesetzt. Für diesen Versuch wurden die Zellen 21 Tage im Dunkeln bei 21°C gehalten. Die Zellen, die mit Rot- bzw. Blaulicht bestrahlt wurden, standen 21 Tage unter Dauerlichtbedingungen. Als blaue Lichtquelle diente eine Kombination blauer Leuchtstoffröhren (Philipps TL/O3) mit blauem Signalglas (Emissionsmax. 410 nm). Das Rotlicht entstand durch eine Kombination von Leuchtstoffröhren (Philipps TL 40/15) und 2 mm starkem rotem Plexiglas (Ni 501 Röhm & Haas) (Emissionsmax. 660 nm) (Clauss 1968, Mohr et al. 1964).

2.2. Isolierung von Chloroplasten und Mitochondrien

Es wurden 30 - 35 mm lange Zellen ohne Hüte verwendet. Die Pflanzen wurden mehrmals gewaschen oder gepinselt und anschließend in Isolierungspuffer im Glashomogenisator (Potter-Elvehjem) mit lockerem Pistill homogenisiert (Keck 1964). Die Verunreinigung der Pflanzen kann durch das Pinseln stark herabgesetzt werden (Berger, Diss. 1967). Der Isolierungspuffer hatte folgende Zusammensetzung: 6.7 mM Phosphatpuffer nach Sörensen, 0.33 M Saccharose, 2 mM EDTA, 50 mM MES, 0.05 % Mercaptoäthanol, pH 7.1. Das Homogenat wurde durch 8 Schichten Mull filtriert und das Filtrat bei 200 g für 90 Sekunden zentrifugiert, um größere Zellbruchstücke zu entfernen.

2.3. Trennung der Organellen

2.3.1. Differentielle Zentrifugation

Chloroplasten wurden bei 1000 g für 15 Minuten sedimentiert. Das Sediment wurde 2 bis 3 Mal gewaschen und anschließend in Isolierungspuffer resuspendiert. Aus dem 1000 g-Überstand konnten Mitochondrien durch Zentrifugation bei 12 000 bzw. 15 000 g in 15 Minuten sedimentiert werden. Dieses Sediment wurde vor der Resuspendierung zweimal gewaschen (Yamazaki und Tolbert 1969, Bonner 1967, Morré 1971, Jacobi 1974).

2.3.2. Saccharosedichtegradientenzentrifugation

Die Gesamt-Partikelfraktion der Zellen (200 g - Überstand) wurde durch Zentrifugation bei 30 000 g für 20 Minuten sedimentiert. Das Sediment wurde zweimal gewaschen, in

Isolierungspuffer resuspendiert und auf einem diskontinuierlichen bzw. linearen Saccharosegradienten analysiert. Im linearen Gradienten (15 - 60 % Saccharose g/g) wurden die Organellen durch Zentrifugation für 1 Stunde bei 41 000 g und 4°C aufgetrennt. Die diskontinuierlichen Gradienten setzten sich zusammen aus 2 ml Schichten von 1.8 M, 1.45 M, 1.2 M, 0.9 M und 0.6 M Saccharose in 0.05 M, Phosphatpuffer (1 mM EDTA, 0.05 M MES, 0.05 % Mercaptoäthanol, pH 7.1). Die Zentrifugation dauerte 60 Minuten, 120 bzw. 180 Minuten bei 41 000 g (Rotor SW 41, Spinco Modell L2 65 B) bei 4°C. Nach der Fraktionierung der Gradienten wurden die Saccharosekonzentration, der Chlorophyll- und Proteingehalt und die Enzymaktivitäten der NADH abhängigen Malatdehydrogenase, der NADPH abhängigen Malatdehydrogenase und der Cytochromoxydase bestimmt.

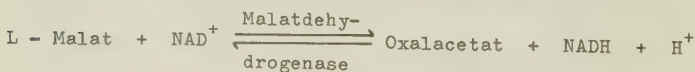
2.4. Enzymnachweise

Die Bestimmungen erfolgten bei 25°C in einem Küvettenhalter, der mit einem Ultrathermostaten temperiert wurde.

2.4.1. NADH abhängige Malatdehydrogenase (NADH-MDH)

Die Aktivität der Malatdehydrogenase (L-Malat:NAD oxydoreductase 1.1.1.37) wurde spektralphotometrisch in Richtung der Oxalacetatreduktion durch Verfolgen der NADH-Oxydation bestimmt (Ochoa 1955, Bergmeyer 1970).

Prinzip der Methode:



Der Testansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 2.59 ml:

0.05 ml Enzym, 0.76 μ mole Oxalessigsäure, 0.18 μ mole NADH in 0.05 M Phosphatpuffer (0.05 % Mercaptoäthanol, pH 7.1). Die Reaktion wurde durch Zugabe des Oxalacetats gestartet, und die Extinktionsabnahme bei 366 $m\mu$ im Beckmann Spektralphotometer DB-GT oder im Eppendorf Photometer gemessen und aufgezeichnet. Die Enzymaktivität wurde als Extinktionsänderung (ΔE_{366} /Minute) oder als Volumenaktivität (mU/ml) angegeben. Eine Einheit (U) entspricht der Enzymaktivität, die die Umwandlung von 1 μ mol NADH pro Minute bewirkt. Die Berechnung der Volumenaktivität erfolgte mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten.

$$\text{Volumenaktivität} = \frac{\Delta E \cdot V \cdot 1000}{\epsilon \cdot d \cdot v} \text{ mU/ml}$$

ΔE = Extinktionsänderung

V = Testvolumen

ϵ = Extinktionskoeffizient (3.3 für NADH bei 366 $m\mu$,
6.22 für NADH bzw. NADPH bei 340 $m\mu$)

d = Schichtdicke

v = Probenvolumen

2.4.2. NADPH abhängige Malatdehydrogenase (NADPH-MDH)

Die NADPH-MDH wurde in Fraktionen bestimmt, die zur vollständigen Aktivierung des Enzyms für mehrere Stunden bei 4°C mit Dithiothreitol (5 mM) vorinkubiert worden waren (Johnson und Hatch 1970). Während des Tests wurde die Oxydation von NADPH bei 340 $m\mu$ in einem Beckmann Photometer DB-GT mit einem Schreiber verfolgt. Der Testansatz enthielt 0.1 ml aktiviertes Enzym und 0.34 μ mole NADPH

in einem Gesamtvolumen von 3 ml 0.05 M Phosphatpuffer pH 7.1. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1.5 μ mole Oxalacetat (0.5 mM) gestartet. Stammlösungen von Oxalacetat (1 mg/ml) und NADPH (1.4 mg/ml) wurden jeweils frisch in Phosphatpuffer hergestellt (Ting und Rocha 1971). Die Enzymaktivität wurde als Extinktionsänderung (ΔE_{340} /Minute) oder als Volumenaktivität (mU/ml) angegeben.

2.4.3. Cytochromoxydase

Die Aktivität der Cytochromoxydase wurde spektralphotometrisch bestimmt (Wharton und Tzagaloff 1967). Die Oxydationsrate von reduziertem Cytochrom c wurde durch die Extinktionsabnahme bei 550 m μ gemessen. Eine 1 % Cytochrom c-Lösung in 0.01 M Kaliumphosphatpuffer pH 7.0 wurde mit einem Überschuß an Ascorbinsäure reduziert. Zur Entfernung der überschüssigen Ascorbinsäure wurde die Lösung 24 Stunden unter dreimaligem Wechsel des Puffers gegen 0.01 M Phosphatpuffer pH 7.0 dialysiert. Der Testansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 2.5 ml: 2 ml 5 mM Phosphatpuffer pH 7.0, 0.2 ml Cytochrom c-Lösung und 0.2 ml 10 % Na-Desoxycholat. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0.1 ml Enzym gestartet. Die spezifische Enzymaktivität wird als Extinktionsänderung pro Zeit und mg Protein angegeben.

2.5. Elektrophoretische Auftrennung der Isoenzyme der Malatdehydrogenase

Die Elektrophorese erfolgte mit einem Ortec-Elektrophorengerät. Die MDH-Isoenzyme wurden nach der Methode von Davis (1964) getrennt. Das Gelsystem bestand aus Trenn-

und Sammelgel. Das Trenngel enthielt 7.5 % Acrylamid in 0.38 M Tris-HCl-Puffer pH 8.9. Die Polymerisation erfolgte mit 0.07 % Ammoniumperoxodisulfat. Das Sammelgel setzt sich zusammen aus 2.5 % Acrylamid in 0.06 M Tris-HCl-Puffer pH 6.9 und 0.1 % Ammoniumperoxodisulfat. Die Stammlösung des Elektrophoresepuffers enthielt 6 g Tris und 28.8 g Glycin pro Liter (pH 8.3). Zum Gebrauch wurde die Lösung 1 : 5 verdünnt. Vor dem Auftragen der Enzymproben wurde das Gel 90 Minuten vorelektrophoresiert. Die Elektrophorese wurde bei 300 V, 45 mA und 300 pps durchgeführt. Die Laufzeit betrug ca. 90 Minuten.

Nach der elektrophoretischen Trennung wurde die Lokalisation der MDH-Isoenzyme mit Hilfe der Nitro-BT-Methode vorgenommen (Fine und Costello 1963). Hierbei wird die Reduktion von NAD mit der Reduktion des löslichen Tetrazoliumsalzes unter Ausbildung eines unlöslichen dunkelblauen Formazans gekoppelt. Am Ort der MDH-Aktivität wird dieses unlösliche Formazan als Bande sichtbar. Die Inkubation der Gele erfolgte bei 4°C im Dunkeln für 8 Stunden. Danach wurden die Gele gründlich mit Wasser gewaschen und fotografiert.

2.6. Chlorophyllbestimmung

Der Chlorophyllgehalt der Organellfraktionen und Saccharosegradientenfraktionen wurde nach Arnon (1949) bestimmt. Das Chlorophyll wurde mit 80 % Aceton extrahiert und die Extinktion bei 652 m μ ermittelt.

2.7. Proteinbestimmung

Protein wurde nach der Methode von Lowry et al. (1951)

mit kristallisiertem Rinderserumalbumin als Standard bestimmt. Der Proteingehalt wurde entweder direkt aus den Fraktionen oder aus dem acetongefällten Material ermittelt.

2.8. Anreicherung und partielle Reinigung der Malatdehydrogenase

Sämtliche Schritte der Präparation wurden bei 4°C durchgeführt.

2.8.1. Homogenisation der Zellen

Die Zellen wurden in Isolierungspuffer oder in 0.05 M Phosphatpuffer, pH 7.1 mit 0.05 % Mercaptoäthanol im Potter-Elvehjem- Homogenisator mit lockerem Pistill homogenisiert. Zur Entfernung der Zellbruchstücke wurde das Homogenat durch 8 Schichten Mull filtriert und bei 200 g für 90 Sekunden zentrifugiert.

2.8.2. Behandlung mit der "Yeda-Press", Rehovot

Um die Organellen aufzubrechen, wurde der 200 g-Überstand 3 Mal durch die "Yeda-Press" mit 1700 p.s.i. geschickt. Zur Entfernung frei gewordener Stärke und Organellreste wurde die Suspension bei 1000 g für 15 Minuten zentrifugiert.

2.8.3. Ammoniumsulfatfällung und Dialyse

Dem 1000 g-Überstand wurde langsam festes Ammoniumsulfat bis zu einer Sättigung von 80 % zugesetzt. Die Fällung blieb für 4 Stunden im Eis stehen. Nach der Zentrifugation bei 40 000 g für 20 Minuten wurde das Sediment in 5 ml

5 mM Phosphatpuffer pH 7.1 mit 0.05 % Mercaptoäthanol resuspendiert. Die Enzymsuspension wurde mit zweimaligem Pufferwechsel für 3 Stunden gegen 700 ml 5 mM Phosphatpuffer dialysiert.

2.8.4. DEAE-Cellulose Chromatographie

Das dialysierte Präparat wurde auf 25 ml verdünnt und auf eine DEAE-Cellulose Säule (Whatman, Microgranular, 1.5 x 12 cm), die mit dem Dialysepuffer äquilibriert worden war, aufgetragen. Die Säule wurde mit 30 ml Äquilibrationsspuffer gewaschen und mit einem linearen Natriumphosphatgradienten (pH 7.1, 10-100 mM) eluiert. Die Durchflußgeschwindigkeit war 36 ml pro Stunde. Es wurden 2.5 ml Fraktionen gesammelt. Die die MDH-Aktivität enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und mit Ammoniumsulfat (80 % Sättigung) gefällt. Nach der Zentrifugation bei 40 000 g für 20 Minuten wurde das Sediment in 5 mM Phosphatpuffer gelöst und die MDH charakterisiert.

2.9. Molekulargewichtsbestimmung

Das Molekulargewicht der partiell gereinigten MDH wurde mit Hilfe einer Sephadex G 200 Säule (1.5 x 30 cm) bestimmt (Andrews 1965). Die Eichung der Säule erfolgte mit Rinderserumalbumin (MG 67 000), Albumin vom Hühnerei (MG 45 000) und Cytochrom aus Pferdeherz (MG 13 000). Ein- und Ausschlußvolumen der Säule wurde mit Phenolrot und Dextranblau ermittelt. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 21,6 ml pro Stunde, und es wurden 1.4 ml Fraktionen gesammelt.

2.10. Chemikalien

Natriumdesoxycholat und Äthylendiamintetraessigsäure waren Produkte der Firma Merck. Cytochrom c aus Pferdeherz, reinst, Rinderserumalbumin, Dithioerythrit, Morpholino-äthansulfonsäure, Acrylamid, reinst, und N, N'-Methylenbisacrylamid wurden von der Firma Serva bezogen. NADH, NADPH, NAD, NADP, Oxalessigsäure und die Eichsubstanzen für die Molekulargewichtsbestimmung waren Produkte der Firma Boehringer. Die Diäthylaminoäthylcellulose war ein Produkt der Firma Whatman.

3. Ergebnisse

3.1. Die Isoenzyme der NADH abhängigen Malatdehydrogenase in Acetabularia mediterranea

Die NADH-MDH von *A. med* ist kein einheitliches Enzymprotein, sondern besteht aus einer Reihe von Isoenzymen (Schweiger et al. 1967). Die Isoenzyme lassen sich in der Polyacrylamidgelelektrophorese nachweisen. Abb. 1 zeigt die elektrophoretische Auftrennung eines Rohhomogenats aus 30-35 mm langen *Acetabularia*-Pflanzen ohne Hut; die MDH-Isoenzyme wurden nach der Elektrophorese mit Hilfe der Nitro-BT-Methode lokalisiert. Die Aufspaltung der MDH in mehrere Banden ist artspezifisch und etwas vom verwendeten Gel/Puffer-System abhängig. Bei *A. med* lassen sich vier Hauptgruppen unterscheiden, die in der Reihenfolge ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit als A, B, C und D-Gruppe bezeichnet werden. Diese Hauptgruppen können ihrerseits wieder in Untergruppen aufspalten.

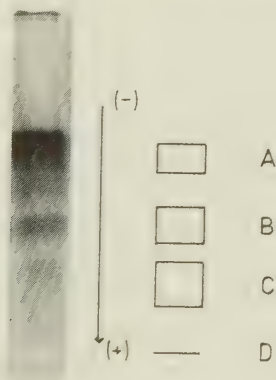


Abb. 1. Das Isoenzymmuster der MDH eines Rohextraktes von *A. med*, (+) und (-) bezeichnen Anode bzw. Kathode, der Pfeil gibt die Wanderungsrichtung an.

3.2. Kompartimentierung der Malatdehydrogenase in *Acetabularia mediterranea*

Die NADH-MDH ist ein Enzym des Citronensäurecyclus, der in den Mitochondrien abläuft. In der Polyacrylamidgелеlektrophorese eines Gesamtexttraktes der Pflanzen erscheinen mehrere Isoenzyme. In den folgenden Experimenten soll gezeigt werden, daß nicht sämtliche Isoenzyme in den Mitochondrien lokalisiert sind, sondern verschiedenen Zellkompartimenten zugeordnet werden können.

3.2.1. Charakterisierung der Zellfraktionen

Um ein Maß für den Gehalt an Chloroplasten und Mitochondrien in bestimmten Zellfraktionen zu erhalten, wurden drei Parameter nach der Zellfraktionierung in den Fraktionen bestimmt. Die Chloroplastenfraktion wurde charakterisiert durch den Chlorophyllgehalt und den Gehalt an NADPH abhängiger MDH (Hatch und Slack 1969, Rocha und Ting 1971). Die Cytochromoxydase ist ein für die Mitochondrien charakteristisches Enzym.

3.2.2. Trennung der Zellfraktionen durch differentielle Zentrifugation und Charakterisierung der Malatdehydrogenase in diesen Fraktionen

Durch differentielle Zentrifugation wurden zwei Fraktionen gewonnen, eine Chloroplastenfraktion bei 1000 g (Rocha und Ting 1970) und eine Mitochondrienfraktion bei 30 000 g (Morré 1971, Bonner 1967).

Tabelle 1 zeigt Protein- und Chlorophyllgehalt dieser Fraktionen und die Gesamtaktivitäten der NADH-MDH, der NADPH-MDH und der Cytochromoxydase, Tabelle 2 zeigt die

Tab. 1. Charakterisierung einer "Chloroplasten"- und einer "Mitochondrien"-Fraktion von 300 A. med-Zellen: Gesamtmenge an Protein und Chlorophyll, NADPH-MDH, Cytochromoxydase und NADH-MDH.

	Prot.	Chlorophyll	NADPH-MDH	Cyt.oxyd.	NADH-MDH
	mg	µg	mU	$\Delta E_{550}/5'$	mU
Chloroplasten	6.2	546	578	0.8	$83 \cdot 10^3$
Mitochondrien	1.2	36	14.5	0.25	$17 \cdot 10^3$

Tab. 2. Charakterisierung einer "Chloroplasten"- und einer "Mitochondrien"-Fraktion von A. med-Zellen, spezifische Aktivität der Cytochromoxydase, NADPH-MDH und NADH-MDH

	Cyt.oxyd./Prot.	NADPH-MDH/Prot.	NADH-MDH/Prot.
	$\Delta E_{550}/5'/\text{mg}$	mU/mg	mU/mg
Chloroplasten	0.13	93	$13.5 \cdot 10^3$
Mitochondrien	0.21	12	$14.4 \cdot 10^3$

Tab. 3. Spezifische Aktivität der Cytochromoxydase und der NADH-MDH in einer "Chloroplasten"-Fraktion und einer gereinigten Mitochondrienfraktion aus 200 A. med-Zellen

	NADH-MDH/Protein	Cyt.oxyd./Protein
	mU/mg	$\Delta E_{550}/5'/\text{mg}$
Chloroplasten	1020	0.03
Mitochondrien	2200	0.29

spezifischen Aktivitäten der drei Enzyme.

Aus Tabelle 1 ist die gegenseitige Verunreinigung der einzelnen Fraktionen ersichtlich. So befinden sich z. B. 76 % der insgesamt nachweisbaren Cytochromoxydaseaktivität in der "Chloroplasten"-Fraktion. Dies bedeutet, daß sich etwa $\frac{3}{4}$ der insgesamt in der Zelle vorhandenen Mitochondrien durch differentielle Zentrifugation nicht von der "Chloroplasten"-Fraktion abtrennen läßt. Die Verunreinigung der "Mitochondrien"-Fraktion mit Chloroplasten ist dagegen weitaus geringer. Nur etwa 6 % des im Gesamthomogenat vorhandenen Chlorophylls und nur 2.5 % der NADPH-MDH befinden sich in der "Mitochondrien"-Fraktion.

Beide Organellfraktionen enthalten NADH-MDH. Bezogen auf den Proteingehalt zeigen sie etwa gleiche spezifische Aktivität (Tab. 2). Die spezifische Aktivität der Cytochromoxydase ist aber in der "Mitochondrien"-Fraktion etwa 1.6 Mal so hoch wie in der "Chloroplasten"-Fraktion. Nimmt man an, daß die spezifische Aktivität der MDH der Mitochondrien in der "Mitochondrien"- und der "Chloroplasten"-Fraktion gleich groß ist, dann zeigt ein Vergleich mit der Cytochromoxydase, daß in der "Chloroplasten"-Fraktion neben der mitochondrialen MDH eine MDH anderer Herkunft vorhanden sein muß.

Die Mitochondrien können durch Zentrifugation auf ein 0.64 M Saccharosekissen weiter gereinigt werden. Chloroplasten und Mitochondrien werden durch differentielle Zentrifugation voneinander getrennt. Anschließend wird die "Mitochondrien"-Fraktion auf ein 0.64 M Saccharosekissen geschichtet und bei 3800 g für 45 Minuten zentri-

fugiert. Aus der Zwischenschicht werden die Mitochondrien isoliert und durch Zentrifugation bei 15 000 g für 20 Minuten sedimentiert. Tabelle 3 zeigt die spezifische Aktivität der NADH-MDH und der Cytochromoxydase einer auf diese Weise erhaltenen Mitochondrien-Fraktion im Vergleich mit einer "Chloroplasten"-Fraktion. Hier ist die spezifische Aktivität der Cytochromoxydase der Mitochondrien-Fraktion etwa 10 Mal höher als diejenige der "Chloroplasten"-Fraktion, die spezifische Aktivität der NADH-MDH ist jedoch nur etwa doppelt so hoch.

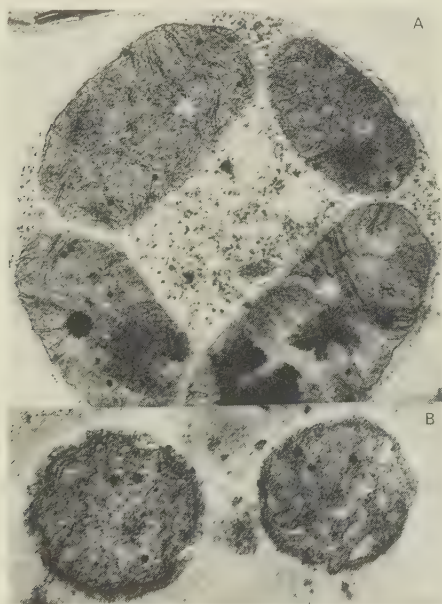


Abb. 2. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Mitochondrien einer gereinigten Mitochondrien-Fraktion, (A) Cytoplast, Vergr.: 40 T, (B) einzelne Mitochondrien, Vergr.: 36 T, Fixierung: Glutaraldehyd-Osmium, Kontrastierung: Uranylacetat-Bleinitrat, Araldit

Dieses Experiment zeigt wie das vorangegangene, daß sich in der "Chloroplasten"-Fraktion neben der mitochondriale MDH eine MDH anderer Herkunft befindet. Die höhere spezifische Aktivität der Cytochromoxydase in dieser Mitochondrien-Fraktion gegenüber der ersten Zentrifugation deutet auf eine Reinigung der Mitochondrien hin.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen dieser gereinigten Mitochondrien-Fraktion zeigen neben wenigen Chloroplasten einzelne und in 'Cytoplasten' enthaltene Mitochondrien (Abb. 2A und B).

Durch die Analyse der Isoenzymmuster der einzelnen Fraktionen kann bestätigt werden, daß sich in der "Chloroplasten"-Fraktion neben der mitochondrialen MDH noch eine andere MDH befindet. Die Isoenzymmuster der MDH der durch differentielle Zentrifugation gewonnenen Zellfraktionen unterscheiden sich deutlich voneinander (Abb. 3).

Abbildung 3a zeigt das Isoenzymmuster eines Rohextraktes, der sowohl Chloroplasten als auch Mitochondrien enthält.

Es sind die Isoenzymgruppen A, B, C und D zu unterscheiden. Abbildung 3b gibt das Isoenzymmuster der "Chloroplasten"-Fraktion wieder, Abbildung 3c, dasjenige der

Mitochondrien. Die Chloroplasten zeigen die Isoenzymgruppen A, B und D, die Mitochondrien die Isoenzymgruppen A,

B und C. Das Isoenzym C scheint für die Mitochondrien, das Isoenzym D für die Chloroplasten charakteristisch zu

sein. Die Isoenzymgruppe A tritt sowohl in der "Chloroplasten"- als auch in der "Mitochondrien"-Fraktion auf,

in der "Chloroplasten"-Fraktion allerdings oft verstärkt. Da die "Mitochondrien"-Fraktion jedoch nur unwesentlich

durch Chloroplasten verunreinigt ist (etwa 6 %), muß man

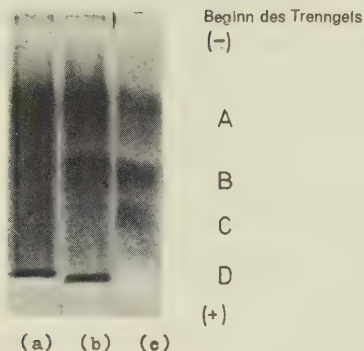


Abb. 3. Das Isoenzymmuster verschiedener Zellfraktionen von A. med nach Polyacrylamidgelelektrophorese (a) Gesamthomogenat nach 200 g Zentrifugation, (b) "Chloroplasten"-Fraktion nach 1000 g Zentrifugation mit den Isoenzymgruppen A, B und D, (c) "Mitochondrien"-Fraktion nach 15 000 g Zentrifugation mit den Isoenzymgruppen A, B und C, es wurden gleiche Mengen Protein pro Fraktion aufgetragen

schließen, daß die in der Elektrophorese zur Position A wandernden Isoenzyme sowohl in der "Chloroplasten"- als auch in der "Mitochondrien"-Fraktion vorhanden sind. Isoenzymgruppe B schließlich tritt meist verstärkt in der "Mitochondrien"-Fraktion auf. Da sich etwa 75 % der insgesamt in der Zelle vorhandenen Mitochondrien in der "Chloroplasten"-Fraktion befinden, ist es möglich, daß die Isoenzymgruppe B kein integraler Bestandteil der "Chloroplasten"-Fraktion ist, sondern von den ebenfalls vorhandenen Mitochondrien stammt. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Mitochondrien

MDH-Isoenzyme mit den elektrophoretischen Wanderungseigenschaften A, B und C enthalten und daß die Chloroplasten-Isoenzyme die Charakteristika A und D besitzen. Ob die in den Chloroplasten vorhandene Isoenzymgruppe B von verunreinigenden Mitochondrien her stammt, ist unklar.

3.2.3. Trennung der Zellfraktionen durch Saccharosedichtegradientenzentrifugation und Charakterisierung der Malatdehydrogenase

Eine Trennung der Zellorganellen durch differentielle Zentrifugation ist nur unvollständig möglich. Um die Auftrennung der Zellfraktionen zu verbessern, wurde die Fraktionierung eines Gesamthomogenats in einem Saccharosedichtegradienten versucht. Abbildung 4 zeigt eine derartige Auftrennung, Abbildung 4A und 4B zeigt sie in einem diskontinuierlichen und Abbildung 4C in einem linearen Gradienten. Die Verteilung der Chloroplasten im Gradienten wurde mit Hilfe ihres Chlorophyllgehalts bestimmt. In beiden Gradiententypen verteilen sich die Chloroplasten charakteristisch in vier Fraktionen, die Peaks sind allerdings im linearen Gradienten nicht so deutlich ausgeprägt. Die Auftrennung der Chloroplasten erfolgt entsprechend ihrer Dichte; die Dauer der Zentrifugation beeinflusst die Lage der Chloroplastenpeaks im Gradienten nicht. Tabelle 4 zeigt, daß die unterschiedliche Dichte der Chloroplastenfraktionen mit ihrem unterschiedlichen Stärkegehalt korreliert ist.

Abbildung 5 zeigt die Auftrennung eines Gesamthomogenats, einer "Chloroplasten"- und einer Mitochondrien-Fraktion von A. med in einem diskontinuierlichen Saccharo-

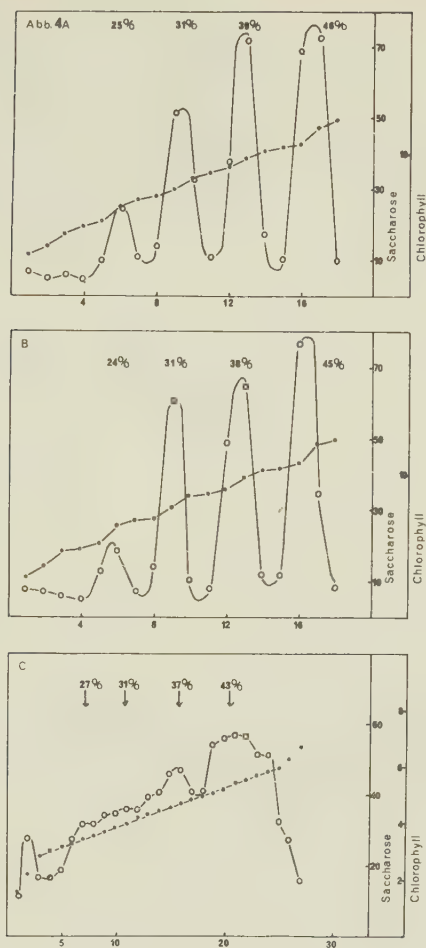


Abb. 4. Fraktionierung der Chloroplasten im Saccharose-dichtegradienten, Zentrifugation bei 41 000 g, (A) diskontinuierlicher Gradient, Zentrifugationsdauer 3 Stunden, Fraktionen a 20 Tropfen, (B) diskontinuierlicher Gradient, Zentrifugationsdauer 1 Stunde, Fraktionen a 20 Tropfen, (C) linearer Gradient (15 - 60 % g/g), Zentrifugationsdauer 1 Stunde, Fraktionen a 15 Tropfen, Saccharosekonzentration (%) - · - · -, Chlorophyll ($\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$) $\circ - \circ - \circ$, Abzisse: Anzahl der Fraktionen, Zahlen in % geben die Saccharosekonzentration der Peaks an

Tab. 4. Stärkegehalt einer im diskontinuierlichen Saccharosegradienten getrennten "Chloroplasten"-Fraktion, angegeben werden der Chlorophyll- und Glucosegehalt bezogen auf ein mg Protein der 4 Chloroplastenfraktionen. Für die Isolierung der Chloroplasten und den Gradienten wurde Tricin-Puffer (0.035 M Tricin pH 8.0, 0.4 M Mannit, 0.02 M MgCl) verwendet (Goffeau 1969). Die Glucose wurde nach der Stärkehydrolyse mit dem Boehringer Glucose UV Test bestimmt.

Saccharose	Chlorophyll/Protein	Glucose/Protein
%	mg/mg	mg/mg
46	0.27	1.8
37	0.24	1.6
31	0.22	0.4
25	0.13	0.2

sgradienten. Die beiden Organellfraktionen wurden wie auf Seite 22 beschrieben hergestellt. Nach der Zentrifugation wurden 10 bis 11 Fraktionen a 30 Tropfen gewonnen, diese wurden mit Puffer verdünnt, für 30 Minuten bei 21 000 g sedimentiert und die Sedimente resuspendiert. Anschließend wurden Chlorophyll- und Proteingehalt und die NADH-MDH-Aktivität bestimmt. Die MDH-Isoenzymmuster der einzelnen Fraktionen wurden in der Gelelektrophorese analysiert.

In diesem Experiment wurden nur drei Chlorophyllpeaks aufgetrennt. Wahrscheinlich war in diesem Gradienten die aufgeschichtete Menge zu gering, um den nahe dem Meniskus liegenden vierten Chlorophyllpeak zu erfassen.

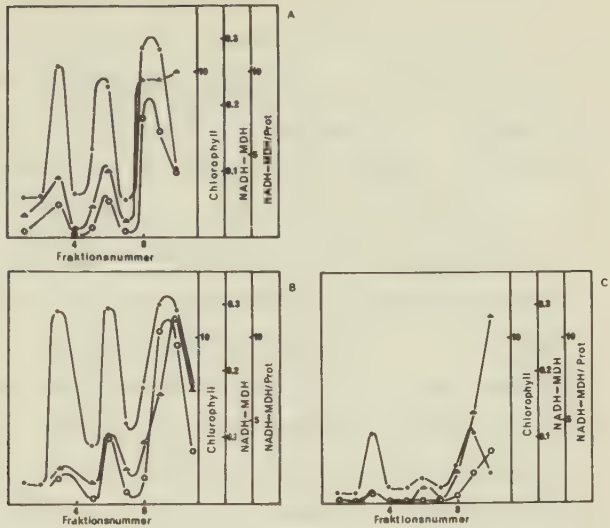


Abb. 5. Auftrennung eines Gesamthomogenats (Chloroplasten und Mitochondrien) (A), einer "Chloroplasten"- (B) und einer "Mitochondrien"-Fraktion (C) in einem diskontinuierlichen Saccharosedichtegradienten, Zentrifugation für 1 Stunde bei 60 000 g, Chlorophyll ($\mu\text{g}/0.45 \text{ ml}$) $\cdots\cdots$, NADH-MDH ($\Delta E_{366}/\text{min}/20 \mu\text{l}$) $\circ-\circ-\circ$, spezifische NADH-MDH ($\Delta E_{366}/\text{min}/\text{mg Prot.}$) $\blacktriangle-\blacktriangle-\blacktriangle$, Abzisse: Zahl der Fraktionen

Die Lage der NADH-MDH Peaks stimmt mit der Position der Chloroplasten in allen drei Gradienten überein. Die spezifische Aktivität der NADH-MDH ist in der dichtesten "Chloroplasten"-Fraktion am höchsten. Die Analyse des Mitochondrien-Gradienten zeigt, daß etwa 90 % der NADH-MDH bis fast zum Boden des Gradienten sedimentiert. Dies läßt vermuten, daß die Acetabularia-Mitochondrien bei dieser Saccharosedichte sedimentieren,

allerdings nicht allein, sondern zusammen mit der dichtesten Chloroplastenfraktion.

Bei lichtmikroskopischer Kontrolle der chlorophyllhaltigen Gradientenfractionen wurde festgestellt, daß der dichteste Chloroplastenpeak vorwiegend große und kleine 'Cytoplasten' neben einigen einzelnen Chloroplasten enthält. Die beiden mittleren Chloroplastenpeaks sind lichtmikroskopisch nicht voneinander zu unterscheiden, sie enthalten neben einzelnen Chloroplasten kleinere 'Cytoplasten', selten sind größere Ansammlungen von Chloroplasten sichtbar. Der leichteste Chloroplastenpeak besteht vorwiegend aus einzelnen Chloroplasten und Chloroplastenbruchstücken. In der dichtesten Chloroplastenfraktion des Mitochondrien-Gradienten konnten bei der angewendeten Methode nur die 'Cytoplasten' nicht aber die Mitochondrien identifiziert werden.

Entsprechend der Anreicherung der Mitochondrien im dichtesten Chloroplastenpeak des Saccharosegradienten (auf grund der hohen NADH-MDH-Aktivität) treten die mitochondrialen Isoenzymgruppen A, B und C bei der Elektrophorese dieser Fraktionen besonders stark hervor.

Die verwendeten Saccharosegradienten sind kein geeignetes Mittel, um Chloroplasten und Mitochondrien von *Acetabularia* voneinander zu trennen.

3.3. Präparative Trennung der Isoenzyme der Malatdehydrogenase von *Acetabularia mediterranea*

Eine Zuordnung der Isoenzyme von *A. med* durch Auftrennung der Organellen ist nur in sehr begrenztem Maße

möglich, da die Auftrennung der Organellen selbst bisher nur unvollständig gelungen ist. Ein anderer Weg, die MDH-Isoenzyme voneinander zu trennen und zu charakterisieren, ist eine partielle Reinigung der Gesamt-MDH mit darauf folgender Trennung der Isoenzyme mit chromatographischen Methoden.

Bei den folgenden Ergebnissen wird nur von der NADH abhängigen MDH berichtet werden. Die NADPH abhängige MDH von *Acetabularia* ließ sich mit den bekannten Nachweismethoden (Johnson und Hatch 1970, Ting und Rocha 1971) nach der Ammoniumsulfatfällung nicht mehr nachweisen.

Gesamt-MDH von etwa 500 Pflanzen wird, wie in Material und Methoden beschrieben, durch Zentrifugation und Ammoniumsulfatfällung vorgereinigt. Sie wird dann auf einer DEAE-Cellulose Säule mit einem Phosphatgradienten chromatographiert.

Die Malatdehydrogenase wird durch die Chromatographie in zwei Fraktionen getrennt, die von der DEAE-Säule bei einer Phosphatkonzentration von 0.026 bzw. 0.056 M Phosphat eluiert werden (Abb. 6).

Die auf der Säule aufgetrennten MDH-Fraktionen wurden in der Polyacrylamidgelelektrophorese auf ihre Isoenzymzusammensetzung hin untersucht (Abb. 7A). In den ersten drei Kammern sind Kontrollproben aufgetrennt und zeigen das Isoenzyymmuster von Chloroplasten und Mitochondrien, die durch differentielle Zentrifugation gewonnen wurden. Bei den Chloroplasten sind die Banden A, B und D und bei dem Mitochondrienpräparat die Banden A, B und C er-

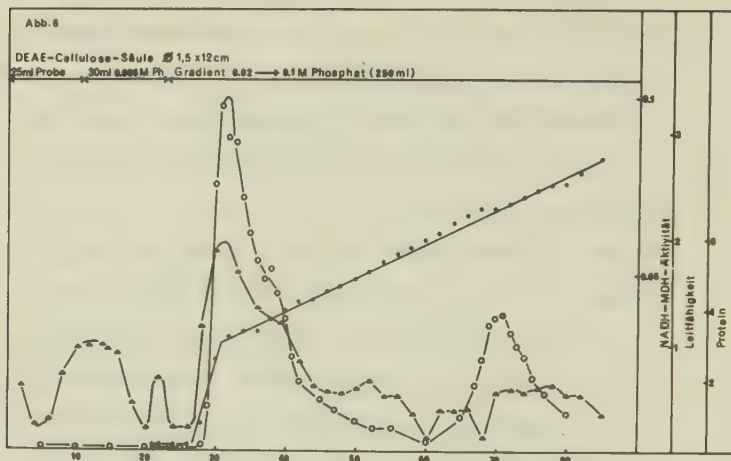


Abb. 6. DEAE-Chromatographie der Gesamt-MDH von A. med; von den Fraktionen sind aufgetragen die NADH-MDH-Aktivität ($\Delta E_{366}/1'/50 \mu\text{l}$) $\circ - \circ - \circ$, der Proteingehalt ($\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$) $\blacktriangle - \blacktriangle - \blacktriangle$ und die Leitfähigkeit (mS) $.-.-.-$, die Zahlen an der Abzisse geben die Anzahl der Fraktionen an (2.5 ml/Fraktion), die Elutionsgeschwindigkeit betrug 36 ml/h, die Peak I Fraktion erscheint bei 1.05 mS = 0.026 M Phosphat, die Peak II Fraktion bei 2.3 mS = 0.056 M Phosphat

kennbar. Die letzte Kammer 11 zeigt das Isoenzymmuster des Extraktes, der auf die Säule gegeben wurde. Dieser Extrakt wird in die Isoenzymbanden A, B und C aufgetrennt, das Isoenzym D ist bei der Vorreinigung verloren gegangen. In den sieben mittleren Kammern wurden einige Fraktionen der beiden von der DEAE-Säule eluierten MDH-Peaks analysiert (Kammer 4 bis 10). In der Fraktion 30 ist nur die Bande A enthalten. Die Fraktio-

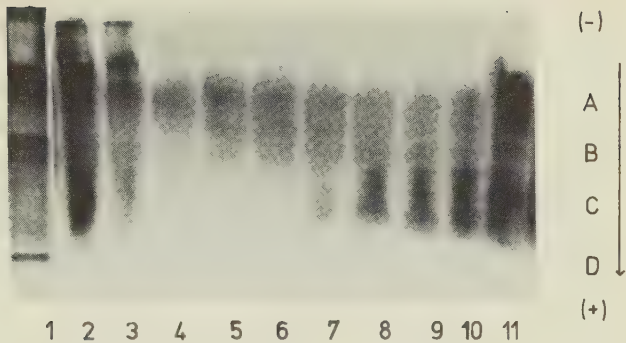


Abb. 7A. Isoenzytmuster der von der DEAE-Säule getrennten NADH-MDH-Fraktionen von *A. med*, die Zahlen geben die Gelkammern an, (+) und (-) bezeichnen Anode bzw. Kathode, der Pfeil gibt die Wanderungsrichtung an, 1 = "Chloroplasten"-Fraktion, 2 = "Mitochondrien"-Fraktion, 3 = wie 2, halbe Konzentration, 4 = Fraktion 30, 5 = Fraktion 32, 6 = Fraktion 34, 7 = Fraktion 65, 8 = Fraktion 68, 9 = Fraktion 70, 10 = Fraktion 74, 11 = vorgereinigter Extrakt, der auf die Säule kam

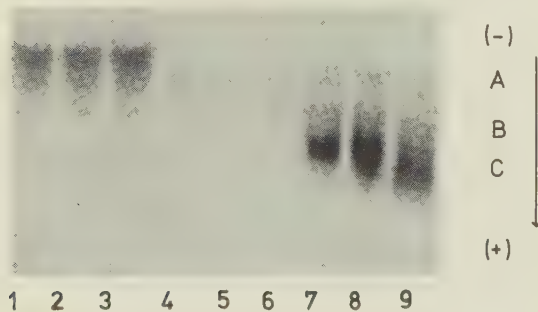


Abb. 7B. Isoenzytmuster der von der DEAE-Säule eluierten NADH-MDH-Fraktionen von *A. med*, die Zahlen geben die Gelkammern an, A, B und C bezeichnen die Isoenzymbanden, (+) und (-) stellen Anode und Kathode und der Pfeil die Wanderungsrichtung dar
Gelkammer 1, 2 und 3 = Peak I Fraktion
Gelkammer 4, 5 und 6 = Fraktionen zwischen den Peaks
Gelkammer 7, 8 und 9 = Peak II Fraktion

nen 32 und 34 sind in die Isoenzymbanden A und B aufgetrennt. Die bei der höheren Phosphatkonzentration von der Säule eluierte MDH-Fraktion (Peak II Fraktion), enthält neben den nur schwach vorhandenen Banden A und B vorwiegend das Isoenzym C.

Abbildung 7B zeigt noch einmal die Analyse von drei Fraktionen einer DEAE-Säule aus drei verschiedenen Bereichen des Elutionsprofils. Peak I Fraktion enthält vorwiegend die Bande A, während das Isoenzym B nur ganz schwach sichtbar ist. In der Region zwischen den Peaks sind die Banden A und B nur sehr schwach erkennbar, während der Hauptbestandteil der Peak II Fraktion das Isoenzym C ist.

Abbildung 8 zeigt die DEAE-Chromatographie der MDH aus einer isolierten "Chloroplasten"- und einer "Mitochondrien"-Fraktion. Die Fraktionen wurden durch differentielle Zentrifugation eines Gesamthomogenats, wie in Material und Methoden beschrieben, gewonnen. Sie wurden ebenso wie die Gesamt-MDH der Zellen aufgearbeitet. Die Organellfraktionen wurden in der "Yeda Press" mit 1700 p.s.i. behandelt, die MDH dann mit Ammoniumsulfat gefällt, dialysiert und anschließend von einer DEAE-Cellulose Säule mit einem Phosphatgradienten eluiert.

Die Analyse beider Organellfraktionen zeigt zwei MDH-Peaks in der DEAE-Chromatographie, die den MDH-Fraktionen I und II des Gesamthomogenats entsprechen. Sie werden von der Säule bei Phosphatkonzentrationen von 0.025 und 0.056 M eluiert. Eine Analyse der MDH-Fraktionen in der Gelelektrophorese zeigt, wie im Falle des Gesamt-

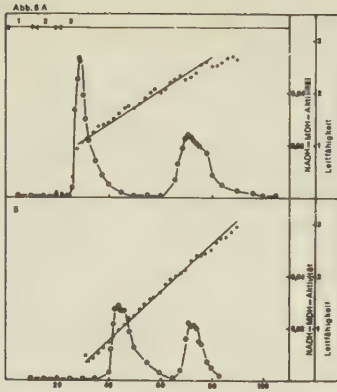


Abb. 8. DEAE-Chromatographie der Malatdehydrogenase einer "Chloroplasten"- (A) und einer "Mitochondrien"-Fraktion (B) von *A. med*, aufgetragen ist die Leitfähigkeit (mS) -.-.- und die NADH-MDH-Aktivität ($\Delta E_{366/1'}$) o-o-o, Abzisse: Zahl der Fraktionen a 2.5 ml bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 24 ml/h, 1 = 25 ml Probe, 2 = 30 ml 0.005 M Phosphatpuffer, 3 = Gradient (A) Gradient von 0.02 bis 0.1 M Phosphat, Gesamtvolumen 300 ml, Peak I bei 0.026 M, Peak II bei 0.058 M Phosphat, (B) Gradient von 0.01 bis 0.1 M Phosphat, Peak I bei 0.024 M und Peak II bei 0.054 M Phosphat

homogenats beschrieben, für die Peak I Fraktion die Isoenzyme A und B und für die Peak II Fraktion vorwiegend das Isoenzym C. Die Analyse der Isoenzyme der Organellfraktionen auf der DEAE-Säule entspricht der Analyse in der Polyacrylamidgelelektrophorese. Der hohe Anteil von Peak II in der "Chloroplasten"-Fraktion entspricht der starken Verunreinigung der Chloroplasten mit Mitochondrien. Die Elution der mitochondrialen

MDH in zwei Peaks auf der DEAE-Säule spiegelt die Auftrennung dieser MDH in mehrere Isoenzyme in der Gelelektrophorese wieder.

Zusammenfassend kann gesagt werden: Die MDH von *Acetabularia mediterranea* kann mit Hilfe der beschriebenen Methode um einen Faktor von 56 bzw. 20 angereichert werden (Tab. 5). Die MDH Fraktionen I und II sind, geschlossen aus der elektrophoretischen Auftrennung und Anfärbung mit Coomassie-Blau, fast vollständig frei von Fremdproteinen (Abb. 9). Bei der DEAE-Chromatographie spaltet die MDH in zwei Peak-Fraktionen auf, die den Isoenzymen A und B bzw. dem Isoenzym C entsprechen.

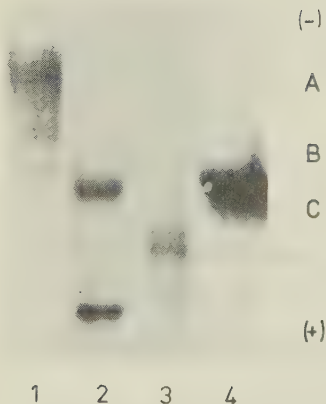


Abb. 9. Das Isoenzymmuster und Proteinmuster der Peak I und Peak II Fraktion von A. med

Kammer 1 = Peak I Fraktion,
Nitro-BT-Anfärbung
Kammer 2 = Peak I Fraktion,
Coomassie-Anfärbung
Kammer 3 = Peak II Fraktion,
Coomassie-Anfärbung
Kammer 4 = Peak II Fraktion,
Nitro-BT-Anfärbung

Tab. 5. Reinigung der Gesamt-MDH von A. med

Reinigungsschritt	Gesamt-MDH mU	Protein mg	spez. Aktivität mU/mg Prot.	Reinigungs- faktor
1 Rohextrakt	70 990	36	1 970	1
2 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung 0-80 %	89 500	33	2 730	1.4
3 Dialyse	85 725	9.5	9 190	4.7
4 DEAE-Cellulose-Chromatographie				
Peak I	3 294	0.03	109 800	56
Peak II	3 148	0.07	43 800	22

3.4. Eigenschaften der Isoenzyme der Malatdehydrogenase

Die weitgehende Reinigung der Malatdehydrogenase aus A. med und die präparative Trennung zweier Isoenzymgruppen voneinander erlaubt es, eine Reihe von Eigenschaften dieser Enzymgruppen, wie Stabilität, pH-Optimum, Temperaturempfindlichkeit, Kinetik und Molekulargewicht vergleichend zu untersuchen.

3.4.1. Stabilität

Je eine Fraktion der von der DEAE-Säule eluierten MDH-Fraktionen I und II wird unter unterschiedlichen Bedingungen und mit unterschiedlichen Zusätzen aufbewahrt. Tabelle 6 gibt die Kombination von Bedingungen und Zusätzen wieder, die getestet wurden.

Einfrieren zerstört die MDH-Aktivität. Bei 4°C ist die Peak II Fraktion sehr viel stabiler als die Peak I Fraktion. Dies mag

Tab. 6. Stabilität der Peak I und Peak II MDH bei unterschiedlichen Inkubationsbedingungen, MDH-Aktivität ($\Delta E_{366}/1'/50 \mu l$)

Peak I MDH	Tag 0	Tag 4	Tag 12
4°C	0.018	0.013	0.005
4°C, 0.1 % RSA		0.013	0.01
4°C, 2 mM EDTA		0.013	0.008
4°C, 0.1 M $(NH_4)_2SO_4$		0.01	0.01
-25°C		0	0

Peak II MDH			
4°C	0.06	0.06	0.053
4°C, 0.1 % RSA		0.06	0.055
4°C, 2 mM EDTA		0.06	0.06
4°C, 0.1 M $(NH_4)_2SO_4$		0.018	0.012
-25°C		0	0

daran liegen, daß die Peak II Fraktion, da sie bei einer höheren Phosphatkonzentration von der Säule eluiert wird, mehr Salz als die Peak I Fraktion enthält. Zusatz von 0.1 M Ammoniumsulfat zur Peak I Fraktion verlangsamt die Inaktivierung, ebenso Zusatz von Rinderserumalbumin oder EDTA. Die Peak II Fraktion ist dagegen über den getesteten Zeitraum ohne Zusätze stabil. Der starke Abfall der MDH-Aktivität bei Zusatz von 0.1 M Ammoniumsulfat zur Peak II Fraktion dürfte darauf zurückzuführen sein, daß das Salzoptimum für die MDH überschritten worden ist.

3.4.2. pH-Optimum

Für sämtliche folgenden Analysen wurden die Fraktionen von Peak I und Peak II gesammelt und mit Ammoniumsulfat (80 % Sättigung) gefällt. Der Niederschlag wurde abentrifugiert und in 0.005 M Phosphatpuffer resuspendiert.

Die Isoenzym-Fractionen I und II zeigen beide ein pH-Optimum zwischen pH 7 und 7.2 (Abb. 10). Die Aktivität der Peak I Fraktion sinkt bei suboptimalen pH-Werten abrupt um etwa 20 %, nimmt aber dann nur langsam mit fallendem pH-Wert weiter ab. Bei höheren pH-Werten erfolgt die Abnahme der Aktivität ebenfalls allmählich. Peak II Fraktion ist in einem etwas breiteren pH-Bereich aktiv als Peak I Fraktion.

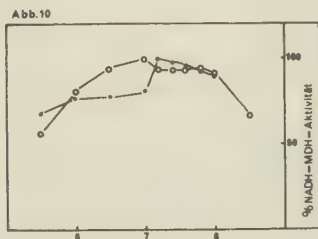


Abb. 10. pH-Optima der Isoenzymfraktion I - - - - - und II $\circ - \circ - \circ$, Abzisse: pH-Wert, Ordinate: %MDH-Aktivität

3.4.3. Temperaturabhängigkeit

Die MDH der Peak II Fraktion wird durch erhöhte Temperatur wesentlich stärker inaktiviert als die MDH der Peak I Fraktion. Dies kann durch zwei Methoden gezeigt werden:

1. Die MDH beider Peak-Fractionen wird im Wasserbad bei Temperaturen von 25° bis 60° C für 10 Minuten inkubiert.

biert. Nach Ablauf dieser Zeit werden die Proben im Eisbad abgekühlt und ihre MDH-Aktivität ermittelt. Die MDH der Peak II Fraktion ist gegen Erwärmung bis zu 40°C empfindlicher als die MDH der Peak I Fraktion. Bei 50°C ist dagegen bei beiden Fraktionen keine MDH-Aktivität mehr nachweisbar (Abb. 11).

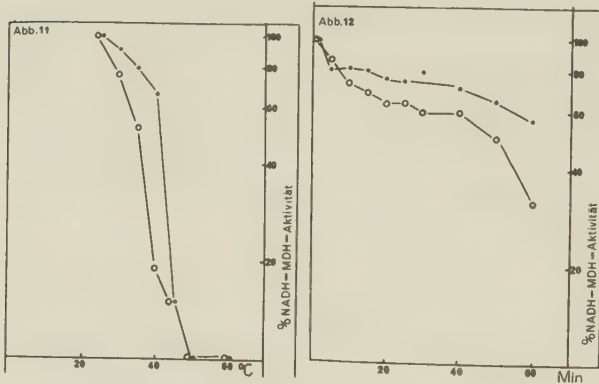


Abb. 11. Abhängigkeit der MDH-Aktivität der Peak I Fraktion •-•-• und der Peak II Fraktion o-o-o von der Temperatur während einer Inkubationszeit von 10 Minuten, Abzisse: Temperatur ($^{\circ}\text{C}$), Ordinate: MDH-Aktivität (%)

Abb. 12. Inaktivierung der MDH von Peak I •-•-• und Peak II o-o-o bei 30°C , Abzisse: Inkubationsdauer (min), Ordinate: MDH-Aktivität (%)

2. Die Isoenzyme werden bei 30°C für maximal 60 Minuten inkubiert und ihre Aktivität in bestimmten Zeitabständen gemessen. Bereits nach Inkubation von fünf Minuten bei 30°C nimmt die Aktivität in beiden MDH-

Fraktionen stark ab. Nach 60 Minuten sind in der Peak I Fraktion noch 55 % der ursprünglichen MDH-Aktivität vorhanden, in der Peak II Fraktion dagegen nur noch 35 % (Abb. 12).

3.4.4. Abhängigkeit der Malatdehydrogenaseaktivität von der Oxalacetatkonzentration

Abbildung 13 zeigt die Abhängigkeit der MDH-Aktivität von der Konzentration des Oxalacetats für die Isoenzymfraktionen I und II und die entsprechenden reziproken Auftragungen nach Lineweaver und Burk.

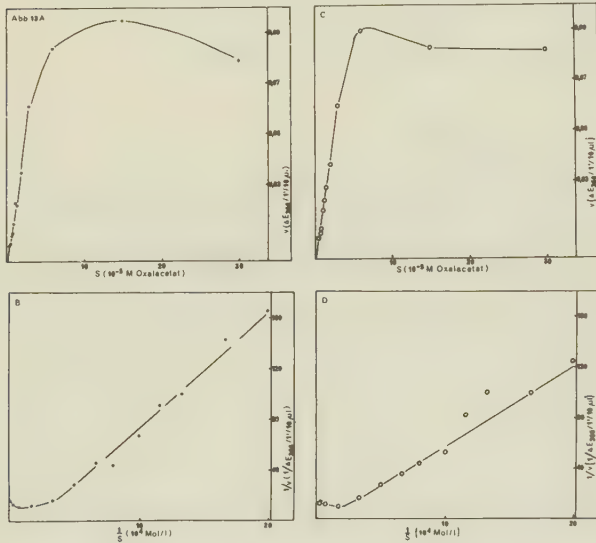


Abb. 13. Abhängigkeit der Aktivität der Fraktion I MDH und der Fraktion II MDH von der Oxalacetatkonzentration A) Fraktion I und C) Fraktion II nach Michaelis und Menten, B) Fraktion I und D) Fraktion II nach Lineweaver und Burk

Beide Enzymfraktionen zeigen keine normale Michaelis-Menten Kinetik. Im Bereich niedriger Substratkonzentrationen zeigt besonders das Enzym aus Peak I eine Aktivierung durch das Substrat selbst. Hohe Substratkonzentrationen hemmen dagegen bei beiden Enzymfraktionen die Enzymaktivität. Die Hemmung erfolgt bei den beiden Isoenzym-Fraktionen bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen. Während die Isoenzym-Fraktion I durch 0.15 mM Oxalacetat gehemmt wird, erfolgt die Hemmung der Isoenzym-Fraktion II schon bei einer Konzentration von 0.06 mM Oxalacetat. Beide Phänomene, Aktivierung und Hemmung, führen zu nicht linearen Lineweaver-Burk Aufträgen, bei denen eine Bestimmung des K_m -Wertes nicht möglich ist (Dixon und Webb 1968).

3.4.5. Molekulargewicht

Auf einer mit Cytochrom c, Ovalbumin und Rinderserumalbumin geeichten Sephadex G 200 Säule zeigt Peak I MDH ein Molekulargewicht von 41 000 Daltons und Peak II MDH ein Molekulargewicht von 39 000 Daltons (Abb. 14).

Die Isoenzym-Fraktion I und II unterscheiden sich also nicht signifikant in ihrem Molekulargewicht.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß sich die Isoenzym-Fraktionen I und II in einer Reihe von Eigenschaften ähneln. Sie unterscheiden sich in ihrer Stabilität, ihrer Temperaturempfindlichkeit, ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit und ihrer Hemmbarkeit durch das Substrat.

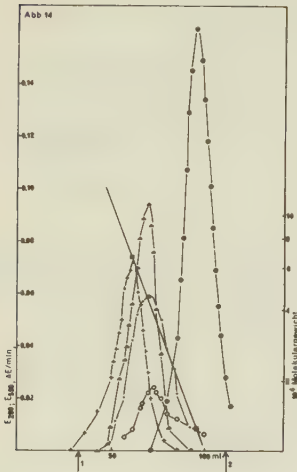


Abb. 14. Molekulargewichtsbestimmung der Peak I und Peak II Fraktion auf einer Sephadex G 200 Säule, Abzisse: Elutionsvolumen, Ordinate, linke Seite: E_{280} , E_{550} , $\Delta E/\text{min}$, rechte Seite: $\log$ Molekulargewicht, Pfeil 1 = Dextranblau, Pfeil 2 = Phenolrot, Rindersealbumin $\times - \times - \times$ (67 000), Albumin von Hühnerei (45 000) $\triangle - \triangle - \triangle$, Cytochrom c (12 500) $\bullet - \bullet - \bullet$, Peak I Fraktion (41 000) $\circ - \circ - \circ$, Peak II Fraktion (39 000) $\circ - \circ - \circ$

3.5. Charakterisierung der Malatdehydrogenase unter unterschiedlichen physiologischen Zuständen der *Acetabularia mediterranea* Zellen

Bei einigen Organismen konnte die Bedeutung von Isoenzymen für die Entwicklung und die Regulation des Zellstoffwechsels gezeigt werden (Atzpodien et al. 1968, Benveniste und Munkres 1970, Hock 1973, Davis und Merrett 1973, Cammaerts und Jacobs 1975). *Acetabularia* macht als Einzelzelle eine Entwicklung mit deutlichem Formwechsel durch, und es ist durch äußere Eingriffe möglich, diese Entwicklung entscheidend zu steuern. In den folgenden Experimenten soll untersucht werden, ob die Eigenschaften der MDH unter verschiedenen Entwicklungsbedingungen verändert werden.

3.5.1. NADH abhängige Malatdehydrogenase in der Entwicklung von *Acetabularia mediterranea*

Um die Frage zu beantworten, ob sich das Isoenzymmuster von *A. med* während der Entwicklung der Pflanze ändert, wurden folgende Entwicklungsstadien zur Untersuchung ausgewählt: a) Keimlinge (etwa 1-2 mm lang), b) junge Pflanzen bis 20 mm lang, c) Pflanzen mit kleinen Hüten (Länge bis 40 mm, Hutdurchmesser bis 3 mm), d) Pflanzen mit großen Hüten (Länge bis 40 mm, Hutdurchmesser 6-7 mm), e) Cysten und f) Gameten. Junge Pflanzen und Pflanzen mit kleinen und großen Hüten wurden in Phosphatpuffer (0.07 M, pH 6.7, 0.33 M Saccharose, 2 mM EDTA, 0.05 M MES, 0.05 % Mercaptoäthanol) in einem Glashomogenisator (Potter Elvehjem) mit lockerem Pistill bei 4°C homogenisiert. Keimlinge und Cysten wurden in Phosphatpuffer im Homogenisator von Braun bei 900 Umdrehungen pro Minute fünf Mal 10 Sekunden unter Kühlung mit Eiswasser zerkleinert. Die Homogenate wurden durch 8 Schichten Mull filtriert und das Filtrat zur Zerstörung der Organellen drei Mal bei 1700 p.s.i. durch die "Yeda Press" geschickt. Gameten wurden in Phosphatpuffer drei Mal bei 1700 p.s.i. durch die "Yeda Press" gegeben. Die Rohhomogenate wurden zur Sedimentation von Zellbruchstücken 10 Minuten lang bei 1000 g zentrifugiert.

In den Überständen wurde der Chlorophyll- und Proteingehalt und die NADH-MDH- und Cytochromoxydase-Aktivität bestimmt. Außerdem wurde die Gesamt-MDH elektrophoretisch untersucht.

Protein- und Chlorophyllgehalt der Zellen nehmen während der Entwicklung von *Acetabularia* zu (Clauss und Werz 1961, Clauss 1968). Die NADH abhängige MDH-Aktivität nimmt in gleicher Rate zu, so daß die spezifische Aktivität der MDH während der Entwicklung der Zellen nahezu konstant bleibt (Tab 7).

Tab.7. Chlorophyll- und Proteingehalt, NADH-MDH- und Cytochromoxydase-Aktivität während der Entwicklung von *A. med*

	Chlorophyll	Protein	spez. NADH-MDH	spez.Cyt.oxy.
	mg/ml	mg/ml	mU/mg Prot.	$\Delta E/5'/\text{mgProt}$
Gameten	0.017	0.2	5.8	-
Keimlinge	0.02	0.3	2.7	-
junge Pfl.	0.04	0.33	8.3	0.9
Pfl. m.kl. Hüten	0.056	0.47	7.4	0.3
Pfl. m.gr. Hüten	0.08	1.06	5.1	0.4
Cysten	0.11	1.1	9.1	0.4

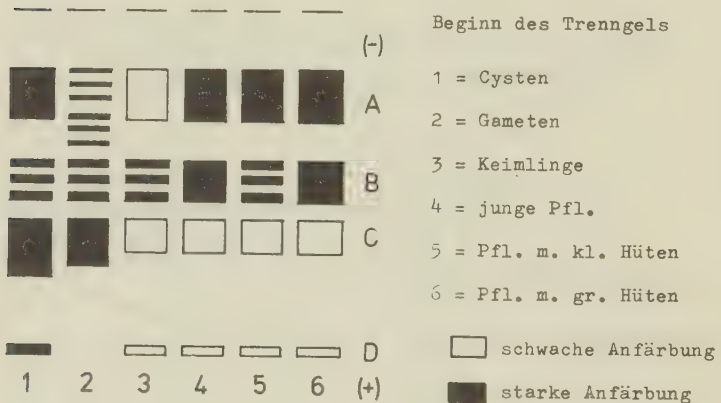
Als Vergleich ist in der Tabelle die spezifische Aktivität der Cytochromoxydase notiert.

Die einzelnen Entwicklungsstadien zeigen deutliche Unterschiede in ihrem MDH-Isoenzymmuster (Abb. 15). Bei den Gameten sind die drei Hauptbanden A, B und C identifizierbar, die Gruppen A und B sind in Unterbanden aufgetrennt, Gruppe C ist als einheitliche starke Bande erkennbar.

Bei den Keimlingen ist die Isoenzymgruppe A nur sehr schwach

angefärbt, Gruppe B ist in Unterbanden aufgetrennt, während die Gruppen C und D nur als schwache Banden erkennbar sind.

Abb. 15. Das Isoenzymmuster der NADH-MDH in der Entwicklung von A. med



Der Extrakt der jungen Pflanzen zeigt die Isoenzymgruppen A und B, Gruppe C ist nur schwach sichtbar, Isoenzym D ist als schmale Bande identifizierbar.

Die Auftrennung der MDH der Zellen mit kleinen Hüten erfolgt in die Gruppen A und B, wobei B in Unterbanden aufgetrennt ist. Die Bande D ist nur schwach erkennbar.

Ähnlich verhält sich das Isoenzymmuster der Pflanzen mit großen Hüten.

Die MDH des Cystenextraktes zeigt in der elektrophoretischen Auftrennung alle vier Isoenzymgruppen. Die

Gruppe B ist in Unterbanden aufgetrennt und das Isoenzym C zeigt eine besonders hohe Aktivität.

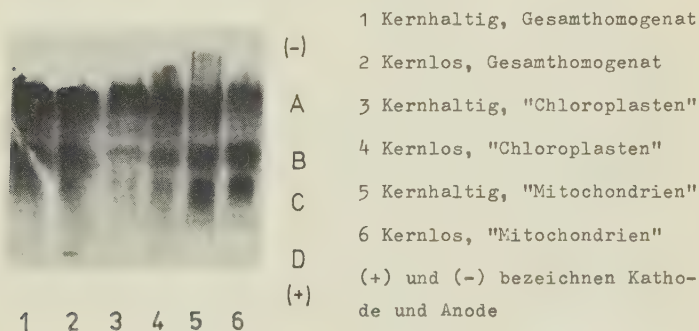
Zusammenfassend kann gesagt werden, daß sich die MDH-

Isoenzymmuster der einzelnen Entwicklungsstadien von A. med deutlich voneinander unterscheiden. Während in den Gameten und Cysten die Isoenzymgruppe C die höchste Aktivität zeigt, tritt dieses Isoenzym in den sich daraus entwickelnden Zellen gegenüber den Gruppen A und B in den Hintergrund.

3.5.2. NADH abhängige Malatdehydrogenase in kernhaltigen und kernlosen Zellen von Acetabularia mediterranea

Um zu prüfen, ob der Kern einen Einfluß auf die Ausbildung der MDH-Isoenzyme hat, wurden kernhaltige und kernlose Zellen von Acetabularia auf ihr MDH-Isoenzymmuster hin untersucht. Nach der Entfernung des Zellkerns wurden die Pflanzen im normalen Hell-Dunkel-Wechsel gehalten. Nach 14 Tagen wurden die Zellen unter Standardbedingungen aufgearbeitet und das Gesamthomogenat, die "Chloroplasten"- und "Mitochondrien"-Fraktion in der Gelelektrophorese aufgetrennt (Abb. 16).

Abb. 16. Isoenzymmuster der MDH in verschiedenen Fraktionen kernhaltiger und kernloser Zellen



In keiner der Zellfraktionen unterscheiden sich die Isoenzymmuster kernhaltiger und kernloser Zellen. Im Gesamthomogenat sind die Isoenzymgruppen A, B, C und D vorhanden. Im "Chloroplasten"-Extrakt ist Isoenzym C nur sehr schwach sichtbar, im "Mitochondrien"-Extrakt fehlt dagegen die Bande D fast vollständig, während die Bande C stark angereichert ist.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die vier MDH-Isoenzymgruppen von der Anwesenheit des Kerns unabhängig sind. Die Entfernung des Kerns beeinflußt das Mengenverhältnis der in der Zelle vorhandenen MDH-Isoenzyme nicht.

3.5.3. Der Einfluß des Lichts auf das Isoenzymmuster der Malatdehydrogenase

Eine beträchtliche MDH-Aktivität ist in der schnell sedimentierbaren Partikelfraktion, die die Chloroplasten enthält, nachweisbar. Feinstruktur und Funktion der Chloroplasten hängen sehr stark von den Lichtbedingungen, unter denen die Pflanzen gezogen werden, ab (Werz 1966, Clauss 1968, Vettermann 1973, Schmid und Clauss 1974). Die folgenden Experimente sollen zeigen, ob die für die "Chloroplasten"-Fraktion charakteristischen Isoenzyme durch die Lichtqualität, in der die Pflanzen gezogen werden, beeinflußt werden.

20 mm lange Zellen von A. med wurden drei Wochen lang in Dauerblau- und Dauerrotlicht, unter normalen Lichtbedingungen und im Dunkeln gehalten. Nach dieser Behandlung wurde eine Roh-, eine "Chloroplasten"- und

"Mitochondrien"-Fraktion hergestellt.

Tabelle 8 zeigt Chlorophyll- und Proteingehalt und die MDH-Aktivität der einzelnen Fraktionen.

Tab. 8. Der Einfluß des Lichts auf Chlorophyll- und Proteingehalt und die spezifische MDH-Aktivität verschiedener Zellfraktionen von A. med

Chlorophyllgehalt (mg/100 Zellen)			
Fraktion	Gesamtfrakt. "Chloroplasten" "Mitochondrien"		
Lichtbedingung			
Normal	3	2.2	0.02
Dunkel	4	4.8	0.04
Dauerblau	4.2	3.0	0.3
Dauerrot	2.4	1.5	0.03

Proteingehalt (mg/100 Zellen)			
Fraktion	Gesamtfrakt. "Chloroplasten" "Mitochondrien"		
Lichtbedingung			
Normal	5.7	3.7	0.03
Dunkel	5.2	2.7	0.5
Dauerblau	7.5	4.1	0.6
Dauerrot	4.8	2.8	0.24

spezifische MDH-Aktivität (mU/mg Protein)			
Fraktion	Gesamtfrakt. "Chloroplasten" "Mitochondrien"		
Lichtbedingung			
Normal	205	285	520
Dauerblau	517	378	483
Dauerrot	873	446	517

Der Chlorophyllgehalt der Pflanzen wird durch die dreiwöchige Dunkelbehandlung nicht herabgesetzt, sondern sogar etwas erhöht. Das gleiche gilt für Zellen, die im Blaulicht gewachsen sind; bei im Rotlicht gewachsenen Zellen ist er dagegen 30 % niedriger.

Der Gesamtproteingehalt ist bei den Zellen unter Blaulichteinfluß stark erhöht (Clauss 1968). Der Proteingehalt der "Chloroplasten"-Fraktion ist bei Pflanzen unter normalen Lichtbedingungen ebenso hoch wie bei Zellen im Blaulicht. Der Proteingehalt von Dunkel- und Rotlichtzellen ist dagegen 40 % niedriger. Chlorophyll- und Proteingehalt der einzelnen Fraktionen verhalten sich in den verschiedenen Lichtbedingungen nicht gleichartig.

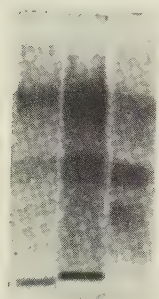
Die spezifische MDH-Aktivität der "Chloroplasten"-Fraktion ist unter normalen Lichtbedingungen niedriger als bei Blau- und Rotlichtzellen; bei Rotlichtzellen ist sie am höchsten. Die spezifische MDH-Aktivität der "Mitochondrien"-Fraktion ändert sich dagegen unter unterschiedlichen Lichtbedingungen nicht.

Die MDH-Isoenzympattern der Gesamthomogenate und der "Chloroplasten"- und "Mitochondrien"-Fraktion sind dagegen von der Lichtvorbehandlung der Pflanzen unabhängig (Abb. 17). In den Gesamthomogenaten findet man bei allen untersuchten Lichtqualitäten die Isoenzymgruppen B, C und D, in der "Chloroplasten"-Fraktion die Gruppen A und D und in der "Mitochondrien"-Fraktion die Gruppen B und C. Die Verunreinigung der Mitochondrien mit Chloroplasten betrug in diesen Experimenten etwa 5 %, nur bei den Blaulichtzellen war sie höher

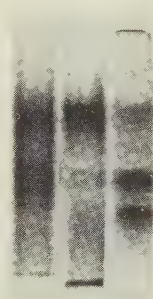
Abb. 17. Der Einfluß des Lichts auf das MDH-Isoenzym-
muster verschiedener Zellfraktionen von *A. med*

Normale Lichtbedingungen

Dunkel

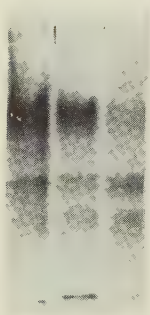


A
B
C
D

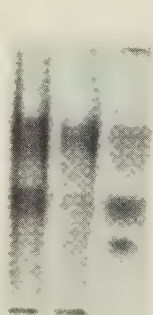


Dauerblaulicht

Dauerrotlicht



A
B
C
D



- 1 = Rohextrakt
2 = "Chloroplasten"-Fraktion
3 = "Mitochondrien"-Fraktion

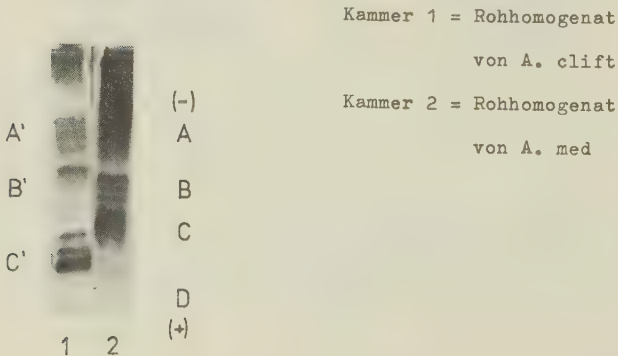
(Tab. 8). Dies macht sich in der verstärkten Anwesenheit des Isoenzym D in der "Mitochondrien"-Fraktion der Blaualichtzellen bemerkbar.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die verschiedenen Lichtbedingungen zwar den Chlorophyll- und Proteingehalt und die spezifische MDH-Aktivität beeinflussen, daß aber die Zusammensetzung der Isoenzymmuster der verschiedenen Organellfraktionen durch die Lichtvorbehandlung nicht beeinflußt wird.

3.6. Kompartimentierung der Malatdehydrogenase bei *Acetabularia cliftonii*

Die Isoenzymmuster von *A. med* und *A. clift* unterscheiden sich beträchtlich (Schweiger et al. 1967, Schweiger et al. 1969, Sandhakchiev et al. 1973, Abb. 18). In den folgenden Experimenten soll untersucht werden, welchen Zellkompartimenten die einzelnen Isoenzyme von *A. clift* zugeordnet werden können. Abbildung 18 zeigt die Auftrennung der MDH eines Rohhomogenats von *A. clift* in die drei charakteristischen Isoenzymbanden, die in

Abb. 18. MDH-Isoenzymmuster von *A. clift* und *A. med*



der Reihenfolge ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit mit A', B' und C' bezeichnet werden. Diese Banden entsprechen RM-Werten (relative Mobilität) von 0.19, 0.30 und 0.53 (Sandhakchiev et al. 1973). Die Isoenzyme A und B von A. med entsprechen in ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit den Isoenzymen A' und B' von A. clift.

Die beiden Arten unterscheiden sich hauptsächlich in der Beweglichkeit des Isoenzym C bzw. C' und darin, daß in A. clift ein dem Isoenzym D entsprechendes Isoenzym fehlt. Die Bande C' wandert in der Elektrophorese weiter zur Anode als die Bande C von A. med.

In den folgenden Experimenten wird gezeigt, daß sich die drei Isoenzyme von A. clift unterschiedlichen Zellkompartimenten zuordnen lassen. Durch differentielle Zentrifugation werden wie vorher beschrieben eine "Chloroplasten"- und eine "Mitochondrien"-Fraktion hergestellt. Die "Chloroplasten"-Fraktion wird durch ihren Chlorophyllgehalt und die Aktivität der NADPH abhängigen MDH charakterisiert. Zur Charakterisierung der "Mitochondrien"-Fraktion wird das spezifische Mitochondrienenzym Cytochromoxydase bestimmt. Tabelle 9 zeigt die ermittelten Werte für die beiden Organellfraktionen. In Tabelle 10 ist die spezifische Aktivität der drei Enzyme angegeben.

Die gegenseitige Verunreinigung von "Chloroplasten"- und "Mitochondrien"-Fraktion von A. clift und die spezifischen Enzymaktivitäten der beiden Fraktionen entsprechen etwa den Ergebnissen, die mit A. med erhalten wurden. Auch bei A. clift befinden sich

etwa 75 % der insgesamt nachweisbaren Cytochromoxydase in der "Chloroplasten"-Fraktion. Die "Mitochondrien"-Fraktion von *A. clift* ist dagegen etwas stärker als bei *A. med* mit Chloroplasten verunreinigt. 2,4 % des im Gesamthomogenat vorhandenen Chlorophylls und 14.3 % der NADPH-MDH treten in der "Mitochondrien"-Fraktion auf. Beide Organellfraktionen enthalten NADH-MDH mit etwa

Tab. 9. Gesamtgehalt an Protein und Chlorophyll und Gesamt-Aktivität der Enzyme Cytochromoxydase, NADPH-MDH und NADH-MDH der "Chloroplasten"- und "Mitochondrien"-Fraktion von *A. clift*

	Protein	Chloroph.	Cyt.oxyd.	NADH-MDH	NADPH-MDH
	μg	μg	$\Delta\text{E}/5'$	mU	mU
Chloroplasten	5620	648	0.8	5360	58
Mitochondrien	1108	16	0.3	820	9.7

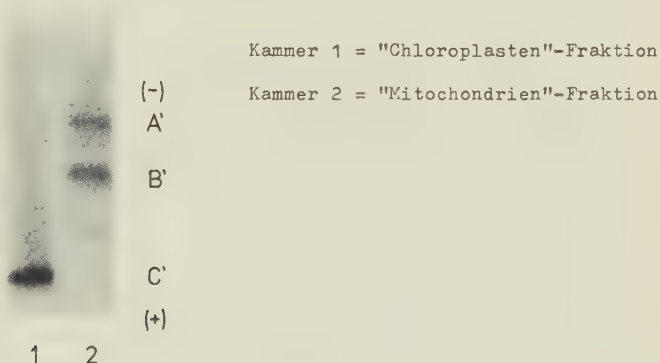
Tab. 10. Spezifische Aktivität der Cytochromoxydase, der NADPH-MDH und der NADH-MDH in einer "Chloroplasten"- und einer "Mitochondrien"-Fraktion von *A. clift*

	Cyt.oxyd./Prot.	NADH-MDH/Prot.	NADPH-MDH/Prot.
	$\Delta\text{E}/5'/\text{mg}$	mU/mg	mU/mg
Chloroplasten	0.14	950	10.3
Mitochondrien	0.27	740	8.7

gleicher spezifischer Aktivität (Tab. 10). Die spezifische Aktivität der Cytochromoxydase ist in der "Mitochondrien"-Fraktion etwa doppelt so hoch wie in der "Chloroplasten"-Fraktion. Auch bei *A. clift* muß also in der "Chloroplasten"-Fraktion neben der mitochondrialen MDH eine MDH eines anderen Zellkompartiments vorhanden sein, vorausgesetzt daß die spezifische Aktivität der mitochondrialen MDH in beiden Fraktionen gleich groß ist.

Die Analyse der MDH in der Polyacrylamidgelelektrophorese zeigt dann auch deutliche Unterschiede in der Isoenzymzusammensetzung der beiden Organellfraktionen (Abb. 19).

Abb. 19. MDH-Isoenzyymmuster der "Chloroplasten"- und der "Mitochondrien"-Fraktion von *A. clift*



Während das Isoenzym C' fast nur in der "Chloroplasten"-Fraktion auftritt, findet man die Isoenzyme A' und B' vorwiegend in der "Mitochondrien"-Fraktion. Damit unter-

scheidet sich die Isoenzymverteilung von *A. clift* sehr wesentlich von derjenigen von *A. med.* Während bei *A. med.* die Isoenzymbanden A und D der "Chloroplasten"-Fraktion zugeordnet werden konnten und das Isoenzym C deutlich mit den Mitochondrien assoziiert war, müssen bei *A. clift* die Isoenzyme A' und B' den Mitochondrien und das Isoenzym C' den Chloroplasten zugeordnet werden.

Es ist möglich, daß sich bei den verschiedenen *Acetabularia*-Arten die Cytoplasmazusammensetzung unterscheidet; dies könnte bewirken, daß die Organellen während der Isolierung unterschiedlich stark zusammengehalten werden. Es wurde daher versucht, ein Gesamtzellhomogenat von *A. clift* durch Saccharosedichtegradientenzentrifugation in Organellfraktionen aufzutrennen.

Abbildung 20 zeigt die Auftrennung eines Gesamthomogenats von 500 Zellen von *A. clift* in einer diskontinuierlichen Saccharosedichtegradientenzentrifugation. Die Verteilung der Chloroplasten in diesem Gradienten wurde durch die Bestimmung des Chlorophylls ermittelt. In den Gradientenfraktionen wurden außerdem die Aktivitäten der Cytochromoxydase, der NADH-MDH und der NADPH-MDH bestimmt. Das Gesamthomogenat wird in vier Chloroplastenfraktionen aufgetrennt (Abb. 20), deren Dichte der Dichte der Chloroplastenfraktionen von *A. med.* entsprechen. Am Meniskus des Gradienten kann freies Chlorophyll nachgewiesen werden. Die NADH-MDH und die Cytochromoxydase sedimentieren mit den Chloroplasten. Die höchste Aktivität der Cytochromoxydase und der NADH-MDH

tritt in der dichtesten "Chloroplasten"-Fraktion auf. Die NADPH-MDH zeigt eine unregelmäßige Verteilung der Aktivität auf die chlorophyllhaltigen Fraktionen. Unter den verwendeten Zentrifugationsbedingungen ist es also, wie bei *A. med*, auch bei *A. clift* nicht möglich, Mitochondrien und Chloroplasten voneinander zu trennen. Der größte Teil der Mitochondrien sedimentiert mit der

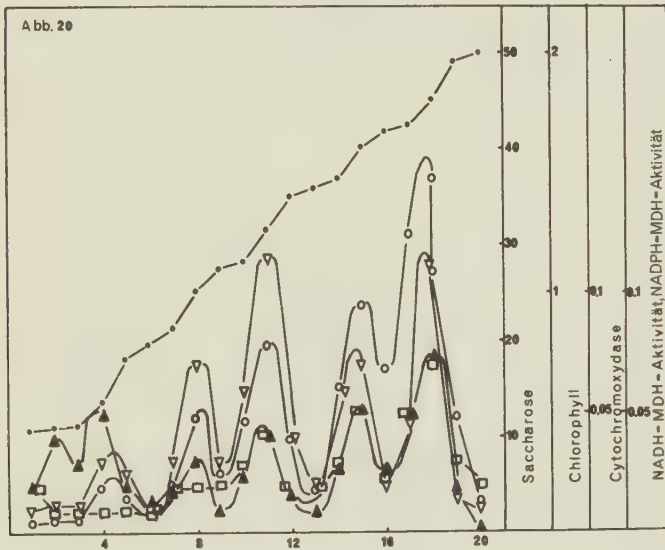


Abb. 20. Fraktionierung eines Gesamtextraktes von *A. clift* in einem diskontinuierlichen Saccharosedichtegradienten, Zentrifugationsdauer 2 h bei 60 000 g im SW 41, der Gradient wurde in 20 Fraktionen à 20 Tropfen fraktioniert, die Zahlen an der Abzisse geben die Zahl der Fraktionen an, Saccharosekonzentration (%) ·····, Chlorophyll (mg/100 µl) ○-○-○, NADH-MDH (ΔE/1'/20 µl) ▲-▲-▲, NADPH-MDH (ΔE/5'/100 µl) △-△-△, Cytochromoxydase (ΔE/5'/100 µl) □-□-□

dichtesten "Chloroplasten"-Fraktion.

Um die Isoenzyme der MDH von *A. clift* voneinander zu trennen, wird die Gesamt-MDH nach partieller Reinigung (s.S. 27) an einer DEAE-Cellulose Säule chromatographiert.

Die MDH wird mit einem Phosphatgradienten von 0,02 M bis 0,15 M in drei Fraktionen von der Säule eluiert. Die drei Isoenzym-Fractionen erscheinen bei den Phosphatkonzentrationen 0,04, 0,095 und 0,128 M (Abb. 21).

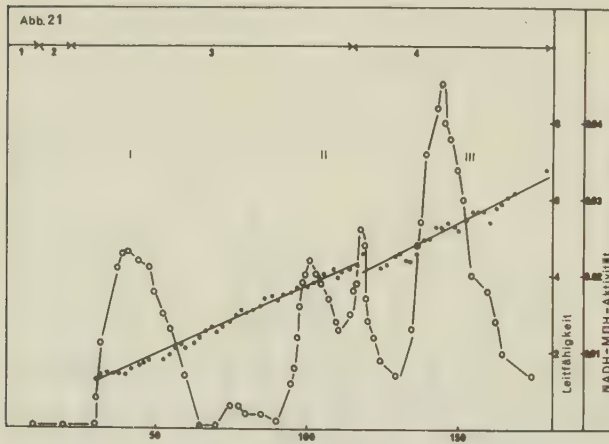


Abb. 21. DEAE-Cellulose Chromatographie der NADH-MDH von *A. clift*

Abzisse: Zahl der Fraktionen à 2,5 ml, 1 = 20 ml Probe, 2 = 30 ml 0,005 M Phosphatpuffer, pH 7,1, 0,05 % Mercaptoäthanol, 3 = Gradient 0,02 M bis 0,1 M Phosphat, 250 ml, 4 = Gradient 0,1 M bis 0,15 M Phosphat, 150 ml, NADH-MDH-Aktivität ($\Delta E/1'/500 \mu l$) $\circ-\circ-\circ$, Leitfähigkeit (mS) $.-.-.-$, I = Peak I Fraktion, 0,04 M Phosphat, II = Peak II Fraktion 0,092 und 0,098 M Phosphat, III = Peak III Fraktion 0,125 M Phosphat

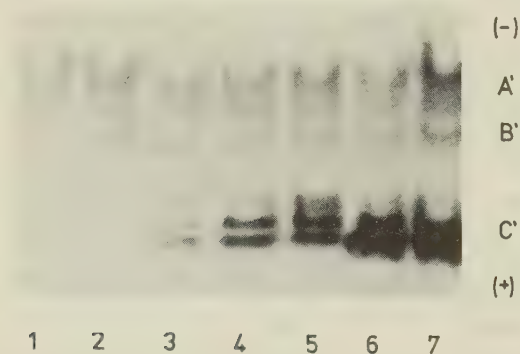
Die Isoenzyme von *A. clift* werden bei höheren Phosphatkonzentrationen von der DEAE-Säule eluiert als diejenigen von *A. med.* Dies entspricht ihrer größeren elektrophoretischen Beweglichkeit in der Polyacrylamidgelelektrophorese (Abb. 18).

Diese drei auf der DEAE-Cellulose Säule getrennten MDH-Fraktionen werden anschließend in der Polyacrylamidgelelektrophorese untersucht (Abb. 22). In Abbildung 22A zeigen die Kammern 1 und 2 das Isoenzymmuster von 2 Säulenfraktionen der Peak I MDH. Die MDH der beiden Fraktionen wird aufgetrennt in die Isoenzyme A' und B'. In den Kammern 3, 4 und 5 werden drei Fraktionen des mittleren Peaks analysiert. Neben den Banden A' und B' ist in diesen Fraktionen das Isoenzym C' vorhanden. Die Kammern 6 und 7 zeigen schließlich die MDH-Isoenzyme der Peak III Fraktion. Das Isoenzym C' ist hier vorwiegend vorhanden, zusätzlich findet man aber die Isoenzyme A' und B'.

Die Fraktionen mit MDH-Aktivität von Peak I, Peak II und Peak III werden jeweils vereinigt und mit 80 % Ammoniumsulfat gefällt. Die Niederschläge wurden nach Resuspendierung in der Gelelektrophorese aufgetrennt (Abb. 22B). In der Kammer 1 des Gels wurde der vorgereinigte Gesamtextrakt, der auf die Säule gegeben wurde, analysiert. Er wird in die Isoenzyme A', B' und C' aufgetrennt. In den Kammern 2 und 3 wurde die MDH der Peak I Fraktion, in den Kammern 4 und 5 die MDH der Peak II Fraktion und in den Kammern 6 und 7 die MDH der Peak III Fraktion aufgetrennt. Das Resultat der

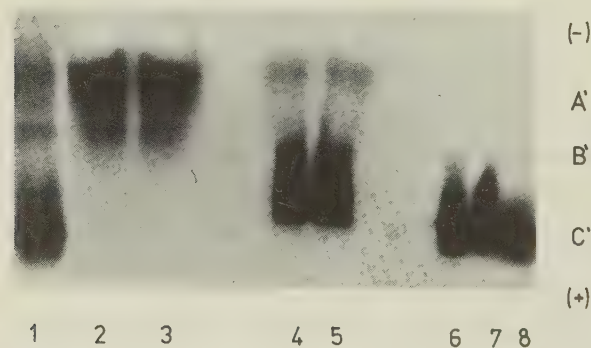
Abb. 22. Das Isoenzymmuster der von der DEAE-Säule eluierten MDH-Fractionen von *A. clift*

A) Elektrophorese von sieben verschiedenen Säulenfraktionen



Kammer 1,2 Peak I MDH
Kammer 3, 4, 5, Peak II MDH
Kammer 6, 7 Peak III MDH

B) Elektrophorese nach Vereinigung der Peak-Fractionen und Fällung mit Ammoniumsulfat



Kammer 1 Gesamtextrakt
Kammer 2, 3 Peak I MDH
Kammer 4, 5 Peak II MDH
Kammer 6, 7, 8 Peak III MDH

Auftrennung entspricht ungefähr der Analyse der Einzelfraktionen. Die Peak I Fraktion enthält die Isoenzyme A' und B'. In der mittleren Peak Fraktion läßt sich neben den Isoenzymen A' und B' überwiegend C' nachweisen. In der Peak III Fraktion ist fast nur das Isoenzym C' vorhanden.

Tabelle 10 zeigt eine Zusammenfassung der Reinigung der Gesamt-MDH von A. clift.

Tab. 10. Reinigung der Gesamt-MDH von A. clift

Reinigungsschritt	Gesamt-MDH mU	Protein mg	spez. Akt. mU/mg Prot.	Reinigungs- faktor
1 Rohextrakt	17 150	12.2	1 400	1
2 (NH ₄) ₂ SO ₄ -Fällung (0-80%)	16 685	8.9	1 880	1.3
3 Dialyse	16 995	4.0	4 270	3.1
4 DEAE-Cellulose Chromatographie				
Peak I	126	0.001	126 000	90
Peak II	472	0.016	29 500	21
Peak III	582	0.02	29 000	21

Die Isoenzyme der Peak I Fraktion sind nach der DEAE-Cellulose Chromatographie 90 fach angereichert. Die MDH der Peak II und Peak III Fraktion ist dagegen nur 20 fach gereinigt. Der Verlust an MDH-Aktivität be-

trägt während der DEAE-Chromatographie 96 - 99 %.

Zusammenfassend läßt sich von der Malatdehydrogenase von *A. clift* folgendes sagen: Sie läßt sich in der Polyacrylamidgelelektrophorese in drei Isoenzyme A', B' und C' auftrennen. Die Isoenzyme A' und B' können den partiell gereinigten Mitochondrien zugeordnet werden, während das Isoenzym C' mit den Chloroplasten assoziiert ist. In der DEAE-Chromatographie lassen sich die drei MDH-Isoenzyme partiell voneinander trennen. Die Peak I Fraktion enthält die Mitochondrien-Isoenzyme A' und B'. Die mittlere Peak-Fraktion stellt ein Gemisch der Peak I und Peak III Fraktion dar. Die Peak III Fraktion enthält das Chloroplasten-Isoenzym C'. Die NADH-MDH ist nach der DEAE-Chromatographie 20 bzw. 90 fach angereichert.

4. Diskussion

In Zellhomogenaten der *Acetabularia*-Arten, *Acetabularia mediterranea* und *Acetabularia cliftonii*, konnten eine NADPH abhängige und eine NADH abhängige Malatdehydrogenase nachgewiesen werden. Die NADPH-MDH kommt in den Chloroplasten der *Acetabularia*-Zelle vor. Die NADH-MDH läßt sich verschiedenen Partikelfractionen der *Acetabularia*-Zelle zuordnen, sie konnte in mehrere Isoenzyme aufgetrennt werden. Die NADH abhängigen Isoenzyme der MDH konnten teilweise gereinigt und voneinander getrennt werden. Sie unterscheiden sich in ihrer Ladung, ihrer Stabilität gegen Temperaturerhöhung und in ihrer Hemmbarkeit durch das Substrat.

4.1. NADPH abhängige Malatdehydrogenase

Die Aktivität der NADPH abhängigen MDH konnte sowohl im Gesamthomogenat der *Acetabularia*-Zelle als auch in der angereicherten "Chloroplasten"-Fraktion spektralphotometrisch nachgewiesen werden. Dadurch wird bestätigt, daß dieses Enzym in den Chloroplasten lokalisiert ist. Es befindet sich im Stroma der Chloroplasten und katalysiert hier die Reduktion von Oxallessigsäure zu Malat unter Verwendung von NADPH als Redoxfaktor (Hatch und Slack 1969, 1970, Johnson und Hatch 1970, Ting und Rocha 1971, Heber 1974).

Das Enzym der *Acetabularia*-Zelle konnte weder nach Ammoniumsulfatfällung (s. S. 41) noch in der Gelelektrophorese mit den verwendeten Bestimmungsverfahren (s. S. 24 und 25) nachgewiesen werden. Es wurde daher nicht wei-

ter charakterisiert, sondern nur als Leitenzym der Chloroplasten bei der Organellfraktionierung verwendet.

4.2. NADH abhängige Malatdehydrogenase

4.2.1. Die NADH abhängigen MDH-Isoenzyme in nichtfraktionierten Zellhomogenaten

Die NADH abhängige MDH von *Acetabularia* kann in der Gelelektrophorese in mehrere Isoenzyme aufgetrennt werden. Die Isoenzyimmuster der Arten *Acetabularia cliftonii* und *Acetabularia mediterranea* unterscheiden sich voneinander. Während in Zellhomogenaten von *A. clift* drei Isoenzyme der MDH nachgewiesen werden (A', B' und C'), kommen in den Zellhomogenaten von *A. med* vier MDH-Isoenzyme vor (A, B, C und D).

Die *Acetabularia*-Arten besitzen also artspezifische Isoenzyimmuster der MDH (Schweiger et al. 1967). Die Wanderungseigenschaften der MDH-Isoenzyme A' und B' und C' aus Homogenaten von *A. clift* lassen vermuten, daß sie den drei Isoenzymen mit den relativen elektrophoretischen Beweglichkeiten von 0.18 - 0.31 - 0.53 (Sandhachiev et al. 1973) entsprechen. Aus *A. med*-Zellhomogenaten lassen sich vier MDH-Isoenzyme auftrennen (A, B, C und D). Bisher sind in Homogenaten von *A. med* nur zwei Isoenzymbanden beschrieben worden (Schweiger et al. 1967, 1969). Auf grund ihrer Wanderungseigenschaften lassen sie sich den Banden A und B zuordnen. Es ist unwahrscheinlich, daß die verschiedenen Resultate in der Zahl der Banden auf Unterschieden in der Elektrophoresetechnik beruhen. Während in dieser Arbeit eine Plattenelektrophorese

benutzt wird, führten Schweiger und Mitarbeiter (1967) die Elektrophorese in Röhrchen durch. Da beide Methoden bei gleichem Gelsystem bei *A. clift* zu identischen Resultaten führen, können die Unterschiede bei *A. med* damit nicht erklärt werden.

Die größere Anzahl der MDH-Isoenzyme bei *A. med* kann auch nicht auf eine starke Verunreinigung der *A. med* Kulturen mit Bakterien zurückgeführt werden, denn vor jeder Aufarbeitung wurden die Zellen mehrmals gewaschen und gepinselt. Berger (Diss. 1967) konnte zeigen, daß durch diese Behandlung die Verunreinigung der Zellen durch Bakterien und Pilze zwar nicht völlig beseitigt, jedoch deutlich herabgesetzt wird.

Eine Erklärung für die Unterschiede der MDH-Muster liegt vielleicht in den unterschiedlichen Enzympräparationen. Während Schweiger und Mitarbeiter (1967) für die Analyse ein 500 g Sediment der *A. med*-Zellen verwendeten, wurde in diesen Untersuchungen die Partikelfraktion bei 30 000 g sedimentiert. Bei 500 g werden weitgehend die Chloroplasten abgetrennt, während nur ein kleiner Teil der Mitochondrien sedimentiert, möglicherweise nur diejenigen, die in 'Cytoplasten' eingeschlossen sind. Freie Mitochondrien werden aufgrund ihrer Partikelgröße und Dichte erst bei höheren Zentrifugalkräften sedimentiert. Dies dürfte erklären, daß die mitochondriale MDH-Bande C von *A. med* in den von Schweiger und Mitarbeitern durchgeführten Analysen nicht auftritt. Das Fehlen der Chloroplastenbande D ist wahrscheinlich auf die große Instabilität

dieses Isoenzyms zurückzuführen (s. S. 43).

4.2.2. Fraktionierung der Zellhomogenate von Acetabularia

Damit die MDH-Isoenzyme bestimmten Zellkompartimenten der Acetabularia-Zelle zugeordnet werden konnten, wurden die Zellorganellen durch Fraktionierung eines Gesamthomogenats angereichert. Die Reinheit der Organellen wurde durch die Bestimmung organellspezifischer Substanzen und Enzyme geprüft (Yamazaki und Tolbert 1969, Johnson und Hatch 1970, s. S. 23). Als charakteristisches Mitochondrienenzym wurde die Cytochromoxydase getestet; Chlorophyll und NADPH abhängige Malatdehydrogenase wurden als chloroplasten-typische Produkte bestimmt.

Zur Auftrennung der Organellen wurden zwei Methoden angewendet, die differentielle Zentrifugation der Zellhomogenate und die Zentrifugation im Saccharosedichtegradienten. Durch differentielle Zentrifugation wurden drei Zellfraktionen erhalten:

1. eine Chloroplastenfraktion, die bei 1000 g sedimentiert (Leech 1964, Goffeau 1965, Shephard et al. 1968),
2. eine Mitochondrienfraktion, die bei 15 000 g abgetrennt wird (Longo und Scandalios 1969, De Jong und Olson 1972, Cammaerts und Jacobs 1975) und
3. ein 15 000 g - Überstand (postmitochondrialer Überstand).

In der "Chloroplasten"-Fraktion befinden sich etwa 75 %

der in der Zelle vorhandenen Mitochondrien. Die Mitochondrienfraktion dagegen ist fast vollständig frei von Chloroplasten.

Bei der Zentrifugation der Zellhomogenate im kontinuierlichen oder diskontinuierlichen Saccharosegradienten werden die Chloroplasten in vier Fraktionen getrennt. Die Mitochondrien jedoch sedimentieren bei dieser Auftrennung zum größten Teil mit der dichtesten Chloroplastenfraktion (s. S. 40).

Die Schwierigkeit, die Organellen von *Acetabularia* voneinander zu trennen, beruhen möglicherweise auf folgenden zwei Eigenschaften der Zellen:

1. Die Viskosität des Cytoplasmas von *Acetabularia* scheint besonders hoch zu sein. Schon sehr früh erkannte Hämmerling die damit verbundenen Vorteile dieser Zelle für Transplantations- und Regenerationsexperimente (s. Lit. Hämmerling 1963). Die hohe Viskosität des Cytoplasmas der *Acetabularia*-Zelle (Clauss 1968, Tandler 1962, Werz 1974) ist die Voraussetzung für viele Experimente, die mit dieser Zelle gemacht wurden.

Für die Isolierung und Auftrennung von Zellorganellen ist die hohe Cytoplasmaviskosität dagegen ein großer Nachteil. Bei der Zerstörung der Zellen durch Zerschneiden oder Homogenisieren im Puffermilieu oder im tiefgefrorenen Zustand gelangt ein Teil des Cytoplasmas in Form von 'Cytoplasten' in den Isolierungspuffer (Gibor 1965). Diese 'Cytoplasten' enthalten durch zufällige Verteilung Chloroplasten, Mitochondrien, Microbodies und andere Vesikel und sind von einer Elementarmembran

umgeben, wie das elektronenmikroskopische Bild zeigt (Shephard 1970, Woodcock und Bogorad 1971, Winkenhach et al. 1972). In der *Acetabularia*-Zelle gibt es Bereiche, in denen bestimmte Organellen konzentriert auftreten, z. B. kleine Chloroplasten (Werz 1959, Boloukhère 1972) und Dictyosomen (Werz 1970, Zerban 1974) in der Zellspitze oder Vesikel entlang der Zellwand (Göke, pers. Mitteil., Zerban 1974). Die 'Cytoplasten' können sich daher in ihrer Organellzusammensetzung unterscheiden, und es kann zu einer Anhäufung bestimmter Organellen in den 'Cytoplasten' kommen. Dies dürfte zu unterschiedlichen Dichten der 'Cytoplasten' führen.

In den durchgeführten Experimenten wurde versucht, sowohl die Bildung der 'Cytoplasten' bereits bei der Homogenisierung zu verhindern, als auch die 'Cytoplasten' zu zerstören, ohne die in ihnen enthaltenen Organellen zu beschädigen. Um die Bildung von 'Cytoplasten' bei der Homogenisation der Zellen zu verhindern, wurden Puffer hoher Kapazität verwendet, da der Zellsaft von *Acetabularia* wegen der stark sauer reagierenden Zellvakuole einen niedrigen pH-Wert besitzt (Tandler 1962, Crawley 1963, Dodd und Bidwell 1971). Um festzustellen, ob das Puffersystem einen Einfluß auf die 'Cytoplasten'-bildung hat, wurden verschiedene Puffer und pH-Werte (Phosphat-, Tris- und Tricinpuffer, pH 6.5, 7.1, 8.0) untersucht. Zur Aufrechterhaltung der Isotonie und Erhaltung der Organellen wurde dem Puffer Saccharose zugesetzt.

Der andere Weg, die Zerstörung der 'Cytoplasten' unter

Erhaltung der Zellorganellen, war bisher nicht erfolgreich (Winkensch et al. 1972). Sämtliche angewendeten Methoden zerstören 'Cytoplasten' und Zellorganellen gleichzeitig. Wird mit hohen Umdrehungszahlen im Glas-homogenisator homogenisiert, dann wird der Zellinhalt zwar schneller im Isolierungspuffer verteilt, aber es werden auch die Organellen zerstört. Wird ein Rohhomogenat von *Acetabularia* mit einem schonenden Detergenz wie Digitonin in verschiedenen Konzentrationen für unterschiedliche Zeiten behandelt, dann wird entweder überhaupt kein Effekt erzielt, oder die Organellen werden aufgebrochen (Winkensch et al. 1972, eigene Ergebnisse). Ähnliches gilt für die Behandlung der Rohhomogenate von *A. med* bei verschiedenen Drucken (50, 75 und 100 atm) in der 'Yeda Press'.

2. Die Chloroplasten der *Acetabularia*-Zelle sind weder in Größe noch Dichte einheitlich; eine Abtrennung der *Acetabularia*-Chloroplasten von Mitochondrien, Dictyosomen und Vesikeln ist daher sehr schwierig. Aus Untersuchungen der Feinstruktur von *Acetabularia*-Chloroplasten geht hervor, daß sie eine unterschiedliche Zahl von Stärkekörnern, Lipidgranula und Thylakoiden besitzen (Werz 1960, 1964, van Gansen und Boloukhère 1965, Boloukhère 1969, Puiseux-Dao und Dazy 1970). Die Verteilung der Chloroplasten in der Zelle folgt einem Gradienten (Hämmerling 1934, Werz 1965, Puiseux-Dao und Dazy 1970, Hoursiangou-Neubrun et al. 1972).

Zur Sedimentation der kleinen Chloroplasten aus der Zellspitze, die bei *Acetabularia* wahrscheinlich die

stoffwechselaktivsten sind (Werz 1965, Issinger et al. 1971), müssen mindestens Zentrifugalbeschleunigungen von 1000 g angewendet werden. Bei derartigen Beschleunigungen sedimentiert bereits ein Teil der Mitochondrien. Aus *Acetabularia*-Homogenaten wurden im Saccharosegradienten vier Chloroplastenfraktionen aufgetrennt, die Dichten von 1.109 g/cm^3 - 1.138 g/cm^3 - 1.178 g/cm^3 - 1.210 g/cm^3 entsprechen. Mitochondrien wurden in der dichtesten Chloroplastenfraktion nachgewiesen (s. S. 41). Die beiden dichteren Fraktionen unterscheiden sich von den beiden leichteren durch einen höheren Stärkegehalt. Es ist jedoch unwahrscheinlich, daß die Fraktionierung der Chloroplasten allein durch den Stärkegehalt bedingt wird. Hält man *Acetabularia*-Zellen für 10 Tage dunkel, dann bauen die Chloroplasten Stärke ab, und es kommt zu einer verstärkten Synthese von Thylakoidmembranen (Werz 1964, 1966, Shephard 1965, Boloukhère 1972, Puiseux-Dao et al. 1972). Eine Zentrifugation aus dunkel gehaltenen Zellen im Saccharosegradienten zeigt aber immer noch eine Auftrennung der Chloroplasten in vier Fraktionen. Der Chlorophyllanteil in den leichteren Chloroplastenfraktionen wird jedoch größer.

Lichtmikroskopische Untersuchungen und der Nachweis von Mitochondrien in den dichteren Chloroplastenfraktionen zeigen, daß 'Cytoplasten' bei der Bildung der vier Chloroplastenfraktionen eine entscheidende Rolle spielen.

In den vier Fraktionen kommt es zu einer Anhäufung recht unterschiedlicher Organellen. In der dichtesten

Chloroplastenfraktion befinden sich 'Cytoplasten' (s. S. 40), Mitochondrien (s. Abb. 4 und S. 41) und stärkereiche Chloroplasten (s. Tab. 4). Die Chloroplastenfraktionen mit der Dichte 1.178 g/cm^3 hat häufig den höchsten Chlorophyllgehalt, hier sammeln sich die meisten Chloroplasten an. In den beiden leichteren Chloroplastenfraktionen kommen neben einzelnen Chloroplasten und Chloroplastenbruchstücken 'Cyoplasten' vor, die aus kleinen stärkearmen Chloroplasten und mehr oder weniger großen Plasmaanteilen bestehen.

Bei einer Reihe anderer Organismen war es möglich, die Zellorganellen durch Zonen-zentrifugation oder isopyknische Zentrifugation voneinander zu trennen (Sager und Ishida 1963, Laycock et al. 1966, Breidenbach und Beevers 1967, Yamazaki und Tolbert 1969, Rocha und Ting 1970, Davis und Merrett 1973, Moore und Beevers 1974). So konnten z. B. beim Spinat Peroxisomen ($q = 1.25 \text{ g/cm}^3$), Mitochondrien ($q = 1.20 \text{ g/cm}^3$) und Chloroplasten ($q = 1.17 \text{ g/cm}^3$) voneinander getrennt werden.

Die hohe Viskosität des Acetabularia-Cytoplasmas, die damit verbundene Cytoplastenbildung und die Heterogenität der Chloroplasten in der Zelle erschwerten dagegen die Gewinnung von reinen Chloroplasten- und Mitochondrienfraktionen bei Acetabularia mit Hilfe der bekannten Zentrifugationsmethoden.

Bei der differentiellen Zentrifugation wurden im 1000 g Sediment 75 % der in der Zelle vorhandenen Mitochondrien nachgewiesen (Tab. 1, 2, 9 und 10). Bei der isopyknischen Gradientenzentrifugation sedimentierten Mitochon-

drien mit den drei dichtesten Chloroplastenfraktionen (s. Abb. 20).

4.2.3. Lokalisation der Malatdehydrogenase

Trotz der geschilderten Schwierigkeiten konnten Zellfraktionen gewonnen werden, die mit bestimmten Organellen angereichert waren und eine Zuordnung der einzelnen MDH-Isoenzyme ermöglichten. Der postmitochondriale Überstand und die Mitochondrienfraktion sind besonders gut charakterisierte Zellfraktionen, während die "Chloroplasten"-Fraktion mit 75 % der in der Zelle vorhandenen Mitochondrien verunreinigt ist. Die durchgeführten Experimente erlauben folgende Schlüsse:

1. Der größte Teil der Malatdehydrogenase sedimentiert mit der Partikelfraktion, nur 2 % der Gesamtaktivität können im postmitochondrialen Überstand nachgewiesen werden. Dieser Überstand wurde eingeengt und in der Gelelektrophorese auf seine Isoenzymzusammensetzung hin untersucht. Die MDH-Isoenzyme sind im Überstand nur in sehr geringer Menge vorhanden, entsprechen in ihren Wanderungseigenschaften den Isoenzymen der Partikelfraktion und stammen wahrscheinlich von Zellorganellen, die während der Aufarbeitung zerstört wurden. Es konnte kein für das Cytoplasma charakteristisches Isoenzym nachgewiesen werden. Der 500 g Überstand von *Acetabularia* enthält 5 % der Gesamtaktivität der Malatdehydrogenase (Schweiger et al. 1967).

Diese Ergebnisse sind insoweit überraschend, als in sehr vielen bisher untersuchten pflanzlichen Organismen der größte Teil der MDH im postmitochondrialen

Überstand nachgewiesen wurde (Munkres und Richards 1965, Ting 1968, Sulebele und Silverstein 1969, De Jong und Olson 1972, Yang und Scandalios 1975). Möglicherweise ist bei *Acetabularia* sämtliche MDH in oder an den Zellorganellen lokalisiert. Es ist unwahrscheinlich, daß das gesamte Cytoplasma von *Acetabularia* in 'Cytoplasten' eingeschlossen ist und damit eventuell vorhandene cytoplasmatische MDH mit den 'Cytoplasten' sedimentiert. Dies kann aber erst getestet werden, wenn es gelingt, die Cytoplastenbildung zu verhindern und cytoplasmafreie Organellen zu isolieren. Eine andere Möglichkeit ist die Bestimmung cytoplasmaspezifischer Enzyme im postmitochondrialen Überstand und in den Organellfraktionen.

2. Die aus *Acetabularia*-Zellen durch differentielle Zentrifugation isolierten Mitochondrienpräparate sind weitgehend frei von Chloroplasten. Die in dieser Fraktion nachweisbaren MDH-Isoenzyme können also den Mitochondrien zugeordnet werden. Bei *A. med* ist das Isoenzym C für die Mitochondrien charakteristisch. Die Mitochondrien von *A. clift* werden durch die MDH-Isoenzyme A' und B' charakterisiert.

In der Mitochondrienfraktion von *A. med* werden neben dem MDH-Isoenzym C noch Isoenzyme mit den Wanderungseigenschaften A und B nachgewiesen. Beide Isoenzyme treten auch in der "Chloroplasten"-Fraktion auf. Da die Mitochondrien jedoch nur unwesentlich mit Chloroplasten verunreinigt sind und Isoenzym B sogar verstärkt in der Mitochondrienfraktion vorhanden ist, muß man

schließen, daß beide Isoenzyme ein integraler Bestandteil der Mitochondrienfraktion sind.

Das Vorkommen mehrerer MDH-Isoenzyme in einer Organellfraktion ist bei anderen pflanzlichen Objekten ebenfalls nachgewiesen worden (Rocha und Ting 1970, De Jong und Olson 1972, Hock 1973 a, Cammaerts und Jacobs 1974, Yang und Scandalios 1975).

3. Es ist bisher nicht möglich, aus *Acetabularia*-Zellen reine Chloroplasten zu isolieren. Die durch differentielle Zentrifugation gewonnene "Chloroplasten"-Fraktion besteht aus Chloroplasten, Mitochondrien und 'Cytoplasten'. Es ist jedoch sicher, daß die "Chloroplasten"-Fraktion MDH-Isoenzyme besitzt, die nicht den Mitochondrien zugerechnet werden können. Dies folgt indirekt daraus, daß die spezifische Aktivität der Cytochromoxydase in dieser "Chloroplasten"-Fraktion niedriger als in der Mitochondrienfraktion ist; die spezifische Aktivität der MDH ist aber gleich groß. Wenn man nicht annimmt, daß die MDH-Aktivität der Chloroplasten verunreinigenden Mitochondrien größer ist als diejenige der freien Mitochondrien, muß man schließen, daß in der "Chloroplasten"-Fraktion neben der mitochondrialen MDH eine MDH eines anderen Zellkompartiments vorhanden ist. Direkt läßt es sich dadurch nachweisen, daß in der "Chloroplasten"-Fraktion andere MDH-Isoenzyme als in der Mitochondrienfraktion auftreten. Die "Chloroplasten"-Fraktion von *A. med* enthält das MDH-Isoenzym D, das in der Mitochondrienfraktion nicht erscheint. Auch das Isoenzym A tritt

in der "Chloroplasten"-Fraktion stärker als in der Mitochondrienfraktion hervor, und ist damit also auch ein integraler Bestandteil der "Chloroplasten"-Fraktion. Die "Chloroplasten"-Fraktion von *A. clift* enthält das MDH-Isoenzym C'.

Es läßt sich bis jetzt nicht sicher entscheiden, mit welchen Bestandteilen der "Chloroplasten"-Fraktion die Malatdehydrogenase assoziiert ist.

Nachdem in früheren Arbeiten (Mukerjee und Ting 1968, Rocha et al. 1968) MDH-Aktivität in oder an den Chloroplasten von Spinat- und Cactusblättern nachgewiesen wurde, zeigten Kontrollversuche, in denen Chloroplasten durch Gleichgewichtszentrifugation gereinigt wurden, daß die Chloroplasten dieser Pflanzen keine NADH abhängige MDH besitzen (Yamazaki und Tolbert 1969, Rocha und Ting 1970). Die Autoren vermuten, daß sich die MDH in den Peroxisomen befindet, die die Chloroplastenfraktion verunreinigten. Auf grund der sehr ähnlichen Sedimentationskoeffizienten beider Organellen konnten sie nur sehr schwer voneinander getrennt werden.

Es ist jedoch sehr unwahrscheinlich, daß ähnliche Verhältnisse bei der "Chloroplasten"-Fraktion von *Acetabularia* vorliegen. Nach der Zentrifugation eines *Acetabularia*-Homogenats bei 1700 g für 15 Minuten enthält das Chloroplastensediment keine Peroxisomen (Shephard 1970). Yamazaki und Tolbert (1969) sedimentieren Peroxisomen auf grund ihrer Dichte bei 6000 g für 20 Minuten.

Sedimentiert man aus einem *A. med*-Homogenat bei 200 g für 30 Minuten den größten Teil der Chloroplasten

und zentrifugiert den Überstand bei 6000 g für 20 Minuten, dann zeigt das Sediment in der Gelelektrophorese sämtliche Isoenzymbanden; das mitochondriale Isoenzym C jedoch verstärkt. Dies ist auf eine teilweise Sedimentation von Mitochondrien bei dieser Zentrifugalkraft zurückzuführen. Ein für die Peroxisomen charakteristisches Isoenzym hätte unter diesen Zentrifugationsbedingungen verstärkt auftreten müssen.

Es scheint, daß die in der "Chloroplasten"-Fraktion auftretenden MDH-Isoenzyme A und D mit den Chloroplasten der Zelle assoziiert sind. In früheren Arbeiten wurde gezeigt (Schweiger et al. 1967), daß die Malatdehydrogenase mit den Chloroplasten assoziiert ist. Die Autoren trennten eine Cytoplasmafraktion in einem nichtwässrigen Dichtegradienten auf und stellten fest, daß das Chlorophyll und die MDH-Aktivität parallel sedimentieren. Sie zeigten außerdem mit histochemischen Methoden, daß MDH mit den Chloroplasten der *Acetabularia*-Zelle assoziiert ist.

Aus den bisher durchgeführten Experimenten läßt sich nicht sagen, ob die MDH in den Chloroplasten lokalisiert ist oder außen an den Chloroplasten sitzt. Sie muß aber in enger Verbindung mit den Chloroplasten vorkommen.

Sicher ist jedoch, daß die Mitochondrienfraktion der *A. med*-Zellen das MDH-Isoenzym C besitzt und daß die Mitochondrienfraktion der *A. clift*-Zellen durch die MDH-Isoenzyme A' und B' charakterisiert wird.

4.2.4. Eigenschaften, Determination und Funktion der Malatdehydrogenase Isoenzyme

4.2.4.1. Eigenschaften

Es ist nicht möglich, die MDH-Isoenzyme von *Acetabularia* durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung voneinander zu trennen. In jeder Ammoniumsulfat-Fraktion (getestet wurden die Fraktionen von 30-40 %, 40-50 %, 50-60 % und 60-70 %) sind sämtliche MDH-Isoenzyme vorhanden. Das chloroplasten-spezifische A. med Isoenzym D wird durch die Ammoniumsulfatfällung anscheinend inaktiviert (s. Abb. 7A). Es kann nach der Fällung nicht mehr im Gel nachgewiesen werden. Es ist möglich, daß Ammoniumsulfat die Struktur dieses Enzyms zerstört, vielleicht durch Ladungsänderung (Green und Hughes 1955).

Das Verhalten der MDH-Isoenzyme von *Acetabularia* gegenüber Ammoniumsulfat steht im Gegensatz zu Befunden bei Isoenzymen anderer Organismen. Die MDH-Isoenzyme von *Citrullus* (Hock 1973 a) und von *Tabaksuspension*skulturen (De Jong und Olson 1972) können durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung voneinander getrennt werden. Dies bedeutet, daß sich die Löslichkeiten der MDH-Isoenzyme von *Acetabularia* nicht so stark voneinander unterscheiden wie diejenigen der MDH-Isoenzyme anderer Organismen.

Die MDH-Isoenzyme von *Acetabularia* können auch nicht aufgrund ihres Molekulargewichts voneinander getrennt werden. Die MDH-Isoenzyme A, B und C von A. med haben ein Molekulargewicht von 40 000 Daltons (s. S. 53).

Chromatographiert man einen Rohextrakt von A. med ohne

partielle Vorreinigung auf einer Sephadex G 200 Säule, so findet man für die MDH ein Molekulargewicht von 67 000 Daltons (Schael und Schweiger unveröff.). Die Reinigung der MDH von A. med (Ammoniumsulfatfällung, Dialyse, DEAE-Cellulose Chromatographie) scheint zu einer Veränderung des Moleküls zu führen, ohne die Enzymaktivität zu beeinflussen.

Wie schon für andere Organismen gezeigt wurde, ist das Molekulargewicht der einzelnen MDH-Isoenzyme nahezu identisch. Mit einem Wert von 40 000 Daltons liegt das Molekulargewicht der MDH-Isoenzyme von Acetabularia deutlich unter demjenigen anderer Organismen, deren Molekulargewicht nie unter 60 000 Daltons liegt (Sulebele und Silverstein 1969, Rocha und Ting 1971, Zschoche und Ting 1973, Hock 1973 b, Yang und Scandalios 1974). Bei einigen Organismen wurden MDH-Isoenzyme mit höheren Molekulargewichten gefunden (140 000 Daltons). Dabei konnte gezeigt werden, daß die Isoenzyme aus zwei oder mehreren Untereinheiten zusammengesetzt waren (Ting 1968, Habig und Racusen 1968, Breidenbach 1969, O'Sullivan und Wedding 1972). Aber auch die MDH mit einem Molekulargewicht von 60 000 Daltons scheint noch nicht das Monomere zu sein. Sie ist aus zwei nahezu identischen Untereinheiten zusammengesetzt (Murphey et al. 1967). Bei Rinderherz-MDH ließen sich nach Denaturierung des Enzyms heterogene Populationen von Molekülen mit Molekulargewichten von 20 000-25 000 Daltons nachweisen (Cassman und King 1972).

Um unterscheiden zu können, ob die Malatdehydrogenase von

Acetabularia aus Untereinheiten zusammengesetzt ist und ob die Isoenzyme mit dem Molekulargewicht von 40 000 Daltons derartige Untereinheiten darstellen, müßte das gereinigte Enzym nach Denaturierung mit Harnstoff oder Guanidinhydrochlorid in der Gelelektrophorese analysiert werden.

Die Isoenzyme der MDH von Acetabularia lassen sich mit den Methoden der Gelelektrophorese und der Ionenaustauscherchromatographie voneinander trennen. Während die Gelelektrophorese zur analytischen Bestimmung der MDH-Isoenzyme besonders geeignet ist, erlaubt die Ionenaustauschchromatographie die präparative Auftrennung der Isoenzyme. Die Polyacrylamidgelelektrophorese trennt Moleküle nach Molekulargewicht und Ladung; die Ionenaustauscherchromatographie trennt entsprechend der Ladung der Moleküle.

Da die Isoenzyme der MDH von Acetabularia gleiches Molekulargewicht besitzen, muß man annehmen, daß sie mit beiden Methoden auf grund der Ladungsunterschiede getrennt werden.

Die Ladungsunterschiede der Acetabularia-Isoenzyme bei gleichem Molekulargewicht lassen folgende zwei Theorien zur Struktur der MDH-Isoenzyme zu:

1. Die MDH-Isoenzyme von Acetabularia bestehen aus gleich langen Polypeptidketten, die sich in einer oder mehreren Aminosäuren voneinander unterscheiden.
2. Die MDH-Isoenzyme bestehen aus mehreren, frei kombinierbaren Untereinheiten der Typen a und b, die gleiche Größe, aber unterschiedliche Ladung besitzen.

Für die erste Theorie ist das Hämoglobin ein Beispiel; die Änderung der Sequenz durch eine Aminosäure verursacht bei diesem Molekül eine Veränderung der elektrophoretischen Beweglichkeit.

Die zweite Theorie ist für die Isoenzyme der Lactatdehydrogenase bewiesen worden (Kowalewski 1972).

Einige Autoren vertreten die Ansicht, daß sie auch für die Isoenzyme der Malatdehydrogenase gilt. Hock (1973 a) vermutet, daß die drei MDH-Isoenzyme des Cytosols von Wassermelonenkeimlingen durch eine Kombination von zwei Polypeptidketten a und b entstehen. Markierungsversuche mit schwerem Stickstoff zeigten, daß die MDH-Isoenzyme des Cytosols und der Mitochondrien von Maisscutellumgewebe aus verschiedenen Unter-einheiten zusammengesetzt sind (Yang und Scandalios 1974). Beide Hypothesen verlangen, daß die Isoenzyme von unterschiedlichen Stellen der DNS der Zelle codiert werden.

Die unterschiedlichen Ladungseigenschaften der MDH-Isoenzyme von *Acetabularia* erlauben ihre präparative Trennung und die Analyse ihrer Eigenschaften.

Die MDH-Isoenzyme von *A. med* unterscheiden sich in ihrer Stabilität. Das chloroplasten-spezifische Isoenzym D wird durch Ammoniumsulfatfällung inaktiviert und verliert seine Aktivität bei Lagerung von Roh- oder Chloroplastenextrakten sehr schnell, sowohl bei 4° C als auch bei -20° C. Wie Isoenzyme A und B der Peak I Fraktion von *A. med* werden bei Lagerung bei 4° C selbst nach Zusatz von Salz oder Rinderserumalbumin schneller inak-

tiviert als das mitochondriale Isoenzym C der Peak II Fraktion.

Umgekehrt verhält es sich dagegen mit der Stabilität gegen Temperaturerhöhung. Das mitochondriale Isoenzym C ist sehr viel empfindlicher gegen Erwärmung als die Isoenzyme A und B. Die in den Mitochondrien vorhandenen Isoenzyme A, B und C besitzen danach unterschiedliche Temperaturempfindlichkeiten. Das Isoenzym D der Chloroplasten ist das temperaturlabilste der MDH-Isoenzyme von *A. med* (Tab. 6, Abb. 11 und 12).

Für eine Reihe von Organismen ist die thermische Stabilität der MDH-Isoenzyme bestimmt worden. Im allgemeinen ist das Isoenzym der löslichen Zellfraktion stabiler gegen Erwärmung als dasjenige der mitochondrialen Fraktion und dieses wiederum stabiler als dasjenige der Microbodyfraktion (Rocha und Ting 1971, Teague und Henney 1973, Zschoche und Ting 1973, Yang und Scandalios 1974). Eine Ausnahme bilden die MDH-Isoenzyme von *Opuntia*, deren Stabilität in der Reihenfolge Chloroplasten-MDH, mitochondriale MDH, lösliche MDH abnimmt (Mukerjee und Ting 1969).

Der pH-Bereich, in dem die MDH-Isoenzyme von *A. med* aktiv sind, ist breit und unterscheidet sich für die einzelnen Isoenzyme kaum. Das pH-Optimum liegt bei pH 7.0 - 7.2. Auch bei anderen Organismen unterscheiden sich die MDH-Isoenzyme nicht in ihrem pH-Bereich (Teague und Henney 1973, Yang und Scandalios 1974).

Die Isoenzyme A und B der Peak I Fraktion und das Isoenzym C der Peak II Fraktion von *A. med* werden durch

oder Mitochondrien-DNS codiert werden.

Longo und Scandalios (1969) konnten zeigen, daß die mitochondrialen MDH-Isoenzyme von *Maisscutellum* nach Mendel'schen Regeln vererbt werden und somit der Kontrolle des Kerngenoms unterliegen.

Nimmt man an, daß auch bei *Acetabularia* sämtliche MDH-Isoenzyme von der Kern-DNS codiert werden, dann müssen die MDH-Isoenzyme auf grund ihrer Eigenschaften von verschiedenen Genorten der Kern-DNS codiert werden. Dann müssen die an der Kern-DNS synthetisierten Messenger-Ribonucleinsäuren im Cytoplasma der Zelle in die entsprechenden MDH-Isoenzyme übersetzt werden. Es ist bis heute nicht bekannt, ob die Translation an den 80 s Ribosomen des Cytoplasmas oder an den 70 s Ribosomen der Zellorganellen erfolgt. Im ersten Fall muß es zu einem Transport der Isoenzyme vom Cytoplasma in die Zellorganellen kommen, im zweiten Fall zu einem Transport der entsprechenden mRNA's.

Untersuchungen zu derartigen Problemen sollten bei *Acetabularia* möglich sein, wenn festgestellt worden ist, welche DNS der *Acetabularia*-Zelle die verschiedenen MDH-Isoenzyme codiert.

4.2.4.3. Funktion

Nach allgemeiner Ansicht ist die mitochondriale MDH an den Prozessen des Citronensäurecyclus in den Mitochondrien beteiligt. Dies gilt sicher auch für die mitochondriale MDH von *Acetabularia*. Sie katalysiert den letzten Schritt des Citronensäurecyclus, in dem

Malat unter Mitwirkung von NAD zu Oxalessigsäure oxydiert wird.

Die MDH-Isoenzyme der Chloroplasten von *Acetabularia* könnten bei zwei Prozessen in der Zelle eine Rolle spielen: bei der Photorespiration und bei der CO_2 -Fixierung. Von einigen Autoren (Yamazaki und Tolbert 1969, Kisaki und Tolbert 1969) wird angenommen, daß die Malatdehydrogenase an der Photorespiration beteiligt ist. Bidwell und Mitarbeiter (1969) zeigten, daß eine gereinigte Chloroplastenfraktion von *Acetabularia*, die offenbar nur geringfügig mit Cytoplasma und Mitochondrien kontaminiert war, im Licht CO_2 entwickelt. Dies ist ein Hinweis darauf, daß die Chloroplasten der Ort der Photorespiration sind. Bei der CO_2 -Fixierung reduziert die NADPH abhängige MDH der Chloroplasten anfallendes Oxalacetat zu Malat. Die Regulation der Malat- und Oxalessigsäurekonzentration in den Chloroplasten und dem Cytoplasma könnte durch NADH abhängige MDH-Isoenzyme vorgenommen werden (Heber 1974). Diese Isoenzyme müßten eng mit der Chloroplastenmembran assoziiert sein, z. B. als Bestandteil der äußeren Chloroplastenmembran (Schnepf 1964).

Die Funktion der MDH-Isoenzyme der Chloroplastenfraktion von *Acetabularia* bleibt so lange Spekulation, bis es gelungen ist, von Cytoplasma und 'Cytoplasten' freie Chloroplastenfraktionen herzustellen.

4.2.5. Die Isoenzyme der Malatdehydrogenase in der Entwicklung und unter unterschiedlichen physiologischen Bedingungen

Acetabularia zeigt während der Entwicklung morphologisch charakteristische Stadien (Lit. Übersicht Hämmerling 1963). Es war daher interessant, zu untersuchen, ob sich die Isoenzyme der Malatdehydrogenase während der Differenzierung von Acetabularia in ihrer qualitativen und quantitativen Zusammensetzung verändern. Änderungen im MDH-Isoenzymmuster sollten eine Korrelation zu den Organellaktivitäten ermöglichen.

Es konnte gezeigt werden, daß sich die MDH-Isoenzymmuster der einzelnen Entwicklungsstadien von Acetabularia deutlich voneinander unterscheiden. Während der generativen Entwicklung der Zelle (Cysten und Gameten) findet man eine besonders hohe Aktivität des mitochondrialen Isoenzym C, während in den vegetativen Stadien dieses Enzym gegenüber den Isoenzymen A, B und D in den Hintergrund tritt. Im Gametenstadium kommt es zu einer charakteristischen Aufspaltung der MDH-Isoenzyme in Unterbanden.

Der Grund für die Veränderung der Aktivität oder der Syntheserate eines der Isoenzyme der Acetabularia-Zelle dürfte die Veränderung der Aktivität, Menge oder Struktur der Zellorganellen sein, mit denen die Isoenzyme assoziiert sind. Es ist bisher jedoch nicht möglich zu sagen, wie die Korrelation zwischen den beschriebenen Veränderungen der Isoenzymmuster und der Veränderung der Zellorganellen während der Entwicklung der Acetabularia-

Zelle aussieht. Aussagen darüber werden besonders dadurch erschwert, daß in den Organellen nicht nur ein, sondern mehrere MDH-Isoenzyme lokalisiert sind, so z. B. in den Mitochondrien von A. med die Isoenzyme A, B und C. Die Aktivitäten dieser Isoenzyme verhalten sich während der Zellentwicklung nicht gleichsinnig. Es muß daher angenommen werden, daß die Aktivitäten oder Syntheseraten der mitochondrialen Isoenzyme während des Differenzierungszyclus von A. med unterschiedlich reguliert werden. Erstaunlich ist die hohe Aktivität des mitochondrialen Isoenzym C in den Gameten und Cysten. Bei den Gameten mag dies auf eine hohe Mitochondrienaktivität hinweisen. Vielleicht setzen bereits in den Gameten energiefordernde Prozesse ein, die für die Vorgänge während oder nach der Gametenfusion von Bedeutung sind (Werz 1974).

Die hohe Aktivität des Mitochondrien-Isoenzym C in den Cysten steht möglicherweise in Zusammenhang mit Syntheseprozessen für die Cystenwandbildung. Junge Cysten scheinen recht aktive Stoffwechsel- und Syntheseprozesse zu besitzen. Darauf weisen die zahlreichen Dictyosomen hin, deren Struktur auf eine hohe Aktivität schließen lassen (Zerban 1974). Eine genaue Synchronisation der Cysten-, Gameten- und Zygotenbildung (Koop 1975) dürfte helfen, den Beginn der Synthese oder Aktivierung von Isoenzym C während der Cystenbildung festzulegen und dieses Phänomen damit verständlicher zu machen. Auch die Analyse der Vorgänge, die zwischen dem Gameten- und Keimlingsstadium liegen, dürfte dadurch erleichtert werden. Während dieser

Zeit kommt es zur Ausbildung des Isoenzymmusters, das für die Wachstumsphase charakteristisch ist.

Veränderungen der MDH-Isoenzymmuster während der Entwicklung sind auch für andere Organismen beschrieben worden (Davis und Merrett 1973, Hock 1973 b, Yang und Scandalios 1975).

Unterbanden im Isoenzymmuster der MDH treten regelmäßig bei der Analyse der Gameten auf und scheinen für diese charakteristisch zu sein. Hock (1973 b) konnte bei Wassermelonensamen zeigen, daß diese Heterogenität durch Mercaptoäthanol aufgehoben werden kann. Dies scheint für die MDH von *Acetabularia* nicht zu gelten, da in allen Präparationen Mercaptoäthanol in gleicher Menge vorhanden war. Es ist bisher nicht bekannt, ob andere Bedingungen bei *Acetabularia* zu einer Vereinheitlichung des Isoenzymmusters führen.

Ein anderer Weg, um die Rolle der MDH in der *Acetabularia*-Zelle zu verstehen, ist die experimentelle Veränderung des physiologischen Zustands der Zellen durch Kernentfernung oder Änderung der Lichtbedingungen (s. Lit. Übersicht Hämmerling 1963, Crawley 1964, Werz 1965, 1966). Die Veränderung der Lichtwellenlänge hat einen besonders starken Einfluß auf die Struktur und Funktion der Chloroplasten der *Acetabularia*-Zelle (Schael und Clauss 1968, Vettermann 1973).

Die durchgeführten Untersuchungen zeigen, daß die Lichtvorbehandlung einen starken Einfluß auf die Aktivität der mit den Chloroplasten assoziierten MDH hat (Tab. 8). Sowohl im Rot- als auch im Blaulicht ist die

spezifische Aktivität der MDH der "Chloroplasten"-Fraktion gegenüber der Weißlichtkontrolle erhöht. Die mitochondriale MDH wird dagegen durch die Lichtvorbehandlung nicht beeinflusst. Dieses Ergebnis ist wiederum ein Hinweis darauf, daß die der "Chloroplasten"-Fraktion zugeordnete MDH eng mit den Chloroplasten assoziiert ist. Eine genaue Analyse der unterschiedlichen physiologischen Zustände, in denen sich die Chloroplasten unterschiedlich vorbehandelter Pflanzen befinden, dürfte uns dem Verständnis der Funktion, die die MDH in der "Chloroplasten"-Fraktion hat, näher bringen.

4.3. Offene Fragen

1. Welche DNS der Zelle codiert für die MDH-Isoenzyme der Mitochondrien, das Kerngenom oder die DNS der Mitochondrien?
2. Wie unterscheiden sich die MDH-Isoenzyme chemisch oder physikalisch voneinander, handelt es sich um Proteine, die sich in einer oder mehreren Aminosäuren unterscheiden oder um aus Untereinheiten aufgebaute Proteine, wie es für die LDH-Isoenzyme gezeigt wurde?
3. Welche Funktion hat die MDH, die mit den Chloroplasten assoziiert ist?

Die ersten beiden Fragen können mit den vorliegenden Methoden und Ergebnissen weiter bearbeitet werden.

Die Resultate, daß MDH-Isoenzyme in den Mitochondrien lokalisiert sind und daß sich die mitochondrialen MDH-

Isoenzyme zweier *Acetabularia*-Arten voneinander unterscheiden, erlauben es mit Hilfe von Transplantationsexperimenten zu zeigen, von welcher DNS der Zelle die mitochondrialen MDH-Isoenzyme codiert werden. Zur Beantwortung der Frage nach der Struktur der MDH-Isoenzyme ist eine vollständige Trennung und Reinigung der Isoenzyme notwendig. Die methodischen Möglichkeiten dazu sind in dieser Arbeit beschrieben worden. Immunologische Tests mit gereinigten Isoenzymen könnten zeigen, in wie weit die Isoenzyme der Malatdehydrogenase miteinander verwandt sind. Die Frage nach der Funktion der MDH, die mit den Chloroplasten assoziiert ist, wird erst dann beantwortet werden können, wenn es gelingt, saubere Chloroplastenpräparate von *Acetabularia* herzustellen.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird über Experimente zur Charakterisierung der Isoenzyme der Malatdehydrogenase von zwei *Acetabularia*-Arten (*Acetabularia mediterranea* und *Acetabularia cliftonii*) mit Hilfe präparativer und analytisch biochemischer Methoden berichtet.

1. In der *Acetabularia*-Zelle ist eine NADPH und eine NADH abhängige Malatdehydrogenase nachweisbar.
2. Die NADPH abhängige Malatdehydrogenase ist in den Chloroplasten der *Acetabularia*-Zelle lokalisiert. Sie ist sehr labil, Ammoniumsulfat inaktiviert das Enzym.
3. Die NADH abhängige Malatdehydrogenase wird in der Polyacrylamidgelelektrophorese in mehrere Isoenzyme aufgetrennt.
4. *Acetabularia mediterranea* besitzt vier Isoenzyme der NADH abhängigen Malatdehydrogenase (A, B, C und D).
5. In *Acetabularia cliftonii* sind, wie schon früher veröffentlicht, drei Isoenzyme der NADH abhängigen Malatdehydrogenase (A', B' und C') nachweisbar. Die Isoenzyme A' und B' zeigen gleiche elektrophoretische Beweglichkeit wie die Isoenzyme A und B von *Acetabularia mediterranea*, C' zeigt eine größere elektrophoretische Beweglichkeit als C.
6. Die Malatdehydrogenase von *Acetabularia mediterranea* wird mit Hilfe der DEAE-Cellulose Chromatogra-

phie in zwei Fraktionen aufgetrennt. Die Peak I Fraktion enthält die Isoenzyme A und B und die Peak II Fraktion das Isoenzym C. Die Peak I Fraktion ist um den Faktor 56 und die Peak II Fraktion um den Faktor 22 angereichert.

7. Die Malatdehydrogenase von *Acetabularia cliftonii* läßt sich durch DEAE-Cellulose Chromatographie in die Isoenzyme A' und B' einerseits und in das Isoenzym C' andererseits auftrennen. Die Isoenzyme A' und B' werden 90-fach und das Isoenzym C' 20-fach angereichert.
8. Die Isoenzyme von *Acetabularia mediterranea* haben ein Molekulargewicht von 40 000 Daltons, ihr pH-Optimum liegt zwischen 7.0 und 7.2. Sie unterscheiden sich in ihrer Ladung, Temperaturempfindlichkeit und ihrer Hemmbarkeit durch das Substrat.
9. Die Zellorganellen von *Acetabularia* lassen sich durch differentielle Zentrifugation teilweise voneinander trennen. Saccharosedichtegradientenzentrifugation ist dagegen kein geeignetes Mittel zur Trennung der Zellorganellen.
10. Nach der Trennung der Zellorganellen durch differentielle Zentrifugation lassen sich in der "Chloroplasten"-Fraktion von *Acetabularia mediterranea* die Isoenzyme A und D nachweisen. Die "Chloroplasten"-Fraktion von *Acetabularia cliftonii* enthält das Isoenzym C'. Die Lokalisation und Funktion dieser Isoenzyme in der "Chloroplasten"-Fraktion werden diskutiert.

11. In der durch differentielle Zentrifugation gewonnenen Mitochondrienfraktion von *Acetabularia mediterranea* lassen sich vorwiegend das Isoenzym C, in derjenigen von *Acetabularia cliftonii* die Isoenzyme A' und B' nachweisen. Die mitochondrialen Malatdehydrogenase Isoenzyme sind artspezifisch.
12. Die Entwicklungsstadien von *Acetabularia mediterranea* unterscheiden sich in ihrem Isoenzymmuster deutlich voneinander. Während der generativen Phase (Cysten und Gameten) zeigt das mitochondriale Isoenzym C die höchste Aktivität.
13. Die Entfernung des Kerns bei *Acetabularia mediterranea* beeinflußt das Mengenverhältnis der in der Zelle vorhandenen Malatdehydrogenase Isoenzyme nicht.
14. Blau- oder Rotlichtbestrahlung erhöht die spezifische Aktivität der mit den Chloroplasten assoziierten Malatdehydrogenase, während die Aktivität der mitochondrialen Malatdehydrogenase nicht verändert wird.
15. Die Analyse der Eigenschaften der Malatdehydrogenase Isoenzyme legt den Schluß nahe, daß sie von unterschiedlichen Teilen der genetischen Substanz in der Zelle codiert werden.

6. Literatur

- Ahmadi, N. and J. P. Ting: Activation of NADP-malate dehydrogenase by lipoate. *Plant Sci. Letters* 1, 11 - 14 (1973)
- Andrews, P.: The gel filtration behavior of proteins related to their molecular weights over a wide range. *Biochem. J.* 96, 595 - 606 (1965)
- Arnon, D. J.: Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant. Phys.* 24, 1 - 15 (1949)
- Atzpodien, W., J. M. Gancedo, W. Dunke, and H. Holzer: Isoenzymes of malate dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 7, 58 - 62 (1968)
- Beevers, H.: Glyoxysomes of Castor bean endosperm and their relation to gluconeogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 168, 313 - 324 (1969)
- Benveniste, K. and K. D. Munkres: Cytoplasmic and mitochondrial malate dehydrogenase of *Neurospora*. Regulatory and enzymic properties. *Biochim. Biophys. Acta* 220, 161 - 177 (1970)
- Berger, S.: RNA-Synthese in isolierten Chloroplasten von *Acetabularia*. *Diss. Universität Köln* (1967)
- Berger, S., L. Sandakhchiev, and H. G. Schweiger: Fine structural and biochemical markers of *Dasycladaceae*. *J. Microscopie* 19, 89 - 104 (1974)
- Bergmeyer, H. U. und E. Bernt: Malatdehydrogenase. In: Bergmeyer, H. U. *Methoden der enzymatischen Analyse*, Vol. I, Verlag Chemie Weinheim/Bergstr. (1970)
- Beth, K.: Entwicklung und Regeneration von *Acicularia schenkii*. *Z. induktive Abstammungs- und Vererbungslehre* 81, 252 - 270 (1943)

Bidwell, R. G. S., W. B. Levin, and D. C. Shephard:

Photosynthesis, photorespiration and respiration
of chloroplasts from *Acetabularia mediterranea*.

Plant Physiol. 44, 946 - 954 (1969)

Boloukhère-Presburg, M.: Ultrastructure de l'algue *Acetabularia mediterranea* au cours du cycle biologique et dans différentes conditions expérimentales.

Diss. Université Libre de Bruxelles (1969)

Boloukhère, M.: Différenciation spatiale et temporelle
des chloroplastes d'*Acetabularia mediterranea*.

J. Microscopie 13, 401 - 416 (1972)

Bonner, W. D.: A general method for the preparation
of plant mitochondria. In: Estabrook,

Meth. Enzymol. X, 126 - 133 (1967)

Breidenbach, R. W.: Characterization of some glyoxysomal proteins. Ann. N. Y. Acad. Sci. 168, 342 - 347 (1969)

Breidenbach, R. W. and H. Beevers: Association of the glyoxylate cycle enzymes in a novel subcellular particle from Castor bean endosperm. Biochem.

Biophys. Res. Commun. 27, 462 - 469 (1967)

Calvin, M. and J. A. Bassham: The photosynthesis of carbon compounds, W. A. Benjamin Inc. N. Y. (1962)

Cammaerts, D. and M. Jacobs: Study of the intracellular location and the genetic control of malate dehydrogenase isozymes in *Arabidopsis thaliana*.

Plant Sci. Letters 4, 249 - 256 (1975)

Cassman, M. and R. King: Molecular weight studies on the supernatant malate dehydrogenase isolated

- from beef heart. Biochim. Biophys. Acta 257,
135 - 142 (1972)
- Chen, S. L., L. R. Towill, and J. R. Loewenborg:
Isoenzyme patterns in developing Xanthium leaves.
Physiol. Plant. 23, 434 - 443 (1970)
- Clauss, H.: Über quantitative Veränderungen der Chlo-
roplasten- und cytoplasmatischen Proteine in kern-
losen Teilen von Acetabularia mediterranea.
Planta 52, 334 - 350 (1958)
- Clauss, H.: Über die Synthese von Acicularia-spezifischen Esterasen in Acicularia-Acetabularia-Transplantaten. Naturwiss. 49, 523 - 524 (1962)
- Clauss, H.: Beeinflussung der Morphogenese, Substanzproduktion und Proteinzunahme von Acetabularia mediterranea durch sichtbare Strahlung. Protoplasma 65, 49 - 80 (1968)
- Clauss, H. und G. Werz: Über die Geschwindigkeit der Proteinsynthese in kernlosen und kernhaltigen Zellen von Acetabularia. Z. Naturforsch. 16b,
162 - 165 (1961)
- Crawley, J. C. W.: The fine structure of Acetabularia mediterranea. Exp. Cell Res. 32, 368 - 378 (1963)
- Crawley, J. C. W.: Cytoplasmic fine structure in Acetabularia. Exp. Cell Res. 35, 497 - 506 (1964)
- Davis, B. J.: Preprint "Disc Electrophoresis" Destillation Prod. Div. Eastman Kodak Co Rochester N. Y. (1962)
- Davis, B. and M. J. Merrett: Malate dehydrogenase isoenzymes in division synchronized cultures of

- Euglena. Plant Physiol. 51, 1127 - 1132 (1973)
- De Jong and A. C. Olson: Electrophoretic migration and redox behavior of malate dehydrogenases from cell suspension cultures of Tobacco. Biochim. Biophys. Acta 276, 53 - 62 (1972)
- Dixon, M. and E. C. Webb: Enzymes p. 75 - 84, Longmans, Green and Co Ltd. London (1964)
- Dodd, W. A. and R. G. S. Bidwell: The effect of pH on the products of photosynthesis in $^{14}\text{CO}_2$ by chloroplast preparations from Acetabularia mediterranea. Plant Physiol. 47, 779 - 783 (1971)
- Fine, J. H. and L. A. Costello: The use of starch gel electrophoresis in dehydrogenase studies. In: S. P. Colowick and N. O. Kaplan: Meth. Enzymol. Vol. VI, p. 958 - 972 (1963)
- Gibor, A.: Surviving cytoplasts in vitro. Proc. Nat. Acad. Sci. 54, 1527 - 1531 (1965)
- Goffeau, A. and J. Brachet: Desoxyribonucleic acid-dependent incorporation of amino acids into the proteins of chloroplasts isolated from anucleate Acetabularia fragments. Biochim. Biophys. Acta 95, 302 - 313 (1965)
- Green, A. A. and W. L. Hughes: Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solutions of salt and organic solvents. In: S. P. Colowick and N. O. Kaplan: Meth. Enzymol. Vol I, 67 - 78 Acad. Press (1955)
- Habig, W. and D. Racusen: A malate dehydrogenase of

- high molecular weight from bean leaves. Can. J. Bot. 46, 719 - 720 (1968)
- Hämmerling, J.: Entwicklung und Formbildungsvermögen von *Acetabularia mediterranea*. Biol. Zentralbl. 51, 633 - 647 (1931)
- Hämmerling, J.: Entwicklung und Formbildungsvermögen von *Acetabularia mediterranea* II. Das Formbildungsvermögen kernhaltiger und kernloser Teilstücke. Biol. Zentralbl. 52, 42 - 61 (1932a)
- Hämmerling, J.: Entwicklung und Regeneration bei *Acetabularia mediterranea* (Ein Beitrag zur Physiologie des Zellkerns). Z. induktive Abstammungs- und Vererbungslehre 62, 92 - 93 (1932b)
- Hämmerling, J.: Entwicklungsphysiologische und genetische Grundlagen der Formbildung bei der Schirmalge *Acetabularia*. Naturwiss. 22, 829 - 836 (1934)
- Hämmerling, J.: Transplantationsversuch zwischen *Acetabularia mediterranea* und *crenulata* (vorläufige Mitteilung) Notizen des deutsch-italienischen Institutes für Meeresbiologie in Rovigno d'Istria 2, 3 - 7 (1940)
- Hämmerling, J.: Entwicklung und Regeneration von *Acetabularia crenulata*. Z. induktive Abstammungs- und Vererbungslehre 81, 84 - 113 (1943)
- Hämmerling, J.: Nucleo-cytoplasmic interactions in *Acetabularia* and other cells. Ann. Rev. Plant Physiol. 14, 65 - 92 (1963)

- Hatch, M. D. and C. R. Slack: Photosynthesis by sugarcane leaves. *Biochem. J.* 101, 103 - 111 (1966)
- Hatch, M. D. and C. R. Slack: NADP-specific malate dehydrogenase and glycerate kinase in leaves and evidence for their location in chloroplasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 34, 589 - 593 (1969)
- Hatch, M. D. and C. R. Slack: Photosynthetic CO₂-fixation pathways. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 21, 141-162 (1970)
- Heber, U.: Metabolic exchange between chloroplasts and cytoplasm. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25, 393 - 421 (1974)
- Hock, B.: Veränderungen des MDH-Isoenzym-Spektrums bei der Samenkeimung der Wassermelone. *Naturwiss.* 58, 566 - 567 (1971)
- Hock, B.: Veränderung des Malat-Dehydrogenase-Isoenzym-spektrums bei der Samenkeimung. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 85, 579 - 584 (1972)
- Hock, B.: Kompartimentierung und Eigenschaften der MDH-Isoenzyme aus Wassermelonenkeimblättern. *Planta* 112, 137 - 148 (1973a)
- Hock, B.: Isoenzyme der Malat-Dehydrogenase aus Wassermelonenkeimlingen: Mikroheterogenität und deren Aufhebung bei der Samenkeimung. *Planta* 110, 329 - 344 (1973b)
- Hotchkiss, D.: Subunit structure of proteins, biochemical and genetic aspects. *Brookhaven Symp. Biol.* 17, 129 - 130 (1964)

- Hoursiangou-Neubrun, D. and S. Puiseux-Dao: Modifica-
tion du gradient apicobasal de la population plasti-
dale chez d'Acetabularia mediterranea. Plant Sci.
Letters 2, 209 - 219 (1974)
- Hoursiangou-Neubrun, D., S. Puiseux-Dao, J. P. Dubacq,
and H. Borghi: Comparative studies on lamellar
morphogenesis in nucleated and anucleated Acetabu-
laria mediterranea. Protoplasma 75, 478 - 479 (1972)
- Issinger, O., I. Maass und H. Clauss: Photosynthesein-
tensität der Stielregionen von Acetabularia mediter-
ranea. Planta 101, 360 - 364 (1971)
- Jacobi, G.: Chloroplasten. In: Jacobi, G. Biochemische
Cytologie der Pflanzenzelle, Georg Thieme Verl.,
Stutt. 1974
- Jacobsen, K. B.: Alcohol dehydrogenase of Drosophila:
Interconversion of isoenzymes. Sci. 159, 324 - 325
(1968)
- Johnson, H. S. and M. D. Hatch: Properties and regula-
tion of leaf nicotinamide-adenine dinucleotide phos-
phate-malate dehydrogenase and 'malic' enzyme in
plants with C₄-dicarboxylic acid pathway of photo-
synthesis. Biochem. J. 119, 273 - 280 (1970)
- Kaplan, N. O.: Symposium on multiple forms of enzymes
and control mechanism. I Multiple forms of enzymes.
Bacteriol. Rev. 27, 155 - 169 (1963)
- Keck, K.: Nucleo-cytoplasmic interactions in the syn-
thesis of species-specific proteins in Acetabularia.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 3, 56 - 61 (1960)
- Keck, K.: Nuclear and cytoplasmic factors determining

- the species specificity of enzyme proteins in *Acetabularia*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 94, 741 - 752 (1961)
- Keck, K.: Culturing and experimental manipulation of *Acetabularia*. In: D. M. Prescott: Methods in Cell Physiology I. New York and London p. 189 - 213 (1964)
- Kisaki, T. and N. E. Tolbert: Glycolate and glyoxylate metabolism by isolated peroxisomes or chloroplasts. Plant Physiol. 44, 242 - 250 (1969)
- Koop, H.-U.: Germination of cysts in *Acetabularia mediterranea*. Protoplasma 84, 137 - 146 (1975)
- Kowalewski, S. L.: Die Isoenzyme der Lactatdehydrogenase. S. 4 - 9, Georg Thieme Verl., Stutt. (1972)
- Laycock, M. V., D. Boulter, and D. A. Thurman: Purification of *Vicia faba* chloroplasts by density gradient centrifugation and an investigation of some of their associated proteins. In: Goodwin, Biochemistry of chloroplasts I, 293 - 298 (1966)
- Leech, R. M.: The isolation of structurally intact chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta 79, 637 - 639 (1964)
- Longo, G. P. and J. G. Scandalios: Nuclear gene control of mitochondrial malicdehydrogenase in Maize. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 62, 104 - 111 (1969).
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall: Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265 - 275 (1951)
- Markert, C. L. and F. Möller: Multiple forms of enzymes: Tissue, ontogenetic, and species specific pattern. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 45, 753 - 763 (1959)

- Mohr, H., U. Meyer und K. Hartmann: Die Beeinflussung der Fransporenkeimung (*Osmunda cinnamomea* (L.) und *O. claytoniana* (L.)) über das Phytochromsystem und die Photosynthese. *Planta* 60, 483 - 496 (1964)
- Moore, T. S. and H. Beevers: Isolation and characterization of organelles from Soybean suspension cultures. *Plant Physiol.* 53, 261 - 265 (1974)
- Morré, D. J.: Isolation of golgi apparatus. In: Jakoby, W. B.: *Meth. Enzymol.* Vol. XXII, S. 130 -148 (1971)
- Mukerjii, S. K. and J. P. Ting: Intracellular localization of CO₂ metabolism enzymes in Cactus phylloclades. *Phytochem.* 7, 903 - 911 (1968)
- Mukerjii, S. K. and J. P. Ting: Malic dehydrogenase isoenzymes in green stem tissue of *Opuntia*: Isolation and characterization. *Arch. Biochem. Biophys.* 131, 336 - 351 (1969)
- Munkres, K. D. and F. M. Richards: The purification and properties of *Neurospora* malate dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* 109, 261 - 265 (1965)
- Munkres, K. D., B. K. Benveniste, J. Gorski, and C. A. Zuiches: Genetically induced subcellular mislocation of *Neurospora* mitochondrial malate dehydrogenase. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 67, 263 - 270 (1970)
- Ochoa, S.: Malic dehydrogenase from pig heart. In: S. P. Colowick and N. O. Kaplan: *Meth. Enzymol.* Vol. I, S. 735 - 739, Acad. Press (1955)
- O'Sullivan, S. A. and R. T. Wedding: Malate dehydrogenase isoenzymes from Cotton leaves. *Plant. Physiol.* 49, 117 - 123 (1972)
- Peak, M. J., J. G. Peak, and J. P. Ting: Isoenzymes

of malate dehydrogenase and their regulation in
Euglena gracilis. Biochim. Biophys. Acta 284, 1 -
15 (1972)

Puiseux-Dao, S. and A. C. Dazy: Plastid structure and
the evolution of plastids in *Acetabularia*. In:
J. Brachet, S. Bonotto: Biology of *Acetabularia*.
N. Y. and London p. 111 - 122 (1970)

Puiseux-Dao, S., A. C. Dazy, D. Hoursiangou-Neubrun,
and H. Borghi: Observations on the apicobasal gradient
of the plastidal population in *Acetabularia*. Pro-
toplasma 75, 484 - 485 (1972)

Reuter, W. und H. G. Schweiger: Kernkontrollierte Lac-
tatdehydrogenase in *Acetabularia*. Protoplasma 68,
357 - 368 (1969)

Richter, G.: Stoffwechselphysiologie der Pflanzen.
Georg Thieme Verl., Stutt. S. 227 (1969)

Rocha, V. and I. P. Ting: Tissue distribution of micro-
body, mitochondrial, and soluble malate dehydrogenase
isoenzymes. Plant Physiol. 46, 754 - 756 (1970)

Rocha, V. and I. P. Ting: Malate dehydrogenase of leaf
tissue from *Spinacia oleracea*: Properties of three
isoenzymes. Arch. Biochem. Biophys. 147, 114 - 122
(1971)

Rocha, V., S. K. Mukerjee, and I. P. Ting: Chloroplast-
malic dehydrogenase: A new malic dehydrogenase isoen-
zyme from spinach. Biochem. Biophys. Res. Commun.
31, 890 - 894 (1968)

Sager, R. and M. R. Ishida: Chloroplast DNA in *Chlamydo-*
monas. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 50, 725 - 730 (1963)

Sandakhchiev, L., R. Niemann, and H. G. Schweiger:

Kinetics of changes of malic dehydrogenase isozyme
pattern in different regions of *Acetabularia* hybrids.
Prot oplasma 76, 403 - 414 (1973)

Scandalios, J. G.: Isozymes in development and differen-
tiation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25, 225 -258
(1974)

Schael, U. und H. Clauss: Die Wirkung von Rotlicht und
Blaulich auf die Photosynthese von *Acetabularia*
mediterranea. *Planta* 78, 98 - 114 (1968)

Schmid, R. und H. Clauss: Die Vermehrung der Chloropla-
sten von *Acetabularia* im Rot- und Blaulicht. *Pro-*
toplasma 82, 283 - 287 (1974)

Schnarrenberger, C., A. Oeser, and N. E. Tolbert: De-
velopment of microbodies in sunflower cotyledons
and castor bean endosperm during germination. *Plant*
Physiol. 48, 566 - 574 (1971)

Schnepf, E.: Zur Feinstruktur von *Geosiphon pyriforme*.
Ein Versuch zur Deutung cytoplasmatischer Membranen
und Kompartimente. *Arch. Mikrobiol.* 49, 112 - 131
(1964)

Schweiger, H. G.: Cell biology of *Acetabularia*. *Curr.*
Top. Microbiol. Immunol. 50, 1 - 36 (1969)

Schweiger, H. G., R. W. P. Master, and G. Merz: Nuclear
control of a cytoplasmic enzyme in *Acetabularia*.
Nature 216, 554 - 557 (1967)

Schulze, K. L.: Cytologische Untersuchungen an *Acetabu-*
laria mediterranea und *Acetabularia wettsteinii*.
Arch. Protistenk. 92, 179 - 225 (1959)

- Shephard, D. C.: Chloroplast multiplication and growth in the unicellular alga *Acetabularia mediterranea*. *Exp. Cell Res.* 37, 93 - 110 (1965)
- Shephard, D. C.: Photosynthesis in chloroplasts isolated from *Acetabularia mediterranea*. In: J. Brachet, S. Bonotto: *Biology of Acetabularia*. New York and London, p. 195 - 212 (1970)
- Shephard, D. C., W. B. Levin, and R. G. S. Bidwell: Normal photosynthesis by isolated chloroplasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 32, 413 - 420 (1969)
- Spencer, T. and H. Harris: Regulation of enzyme synthesis in chloroplasts of *Acetabularia*. *Biochim. Biophys. Acta* 87, 533 - 535 (1964)
- Sulebele, G. and E. Silverstein: Malate dehydrogenase and aspartate aminotransferase of *Phycomyces blakeleeanus*. *Arch. Biochem. Biophys.* 133, 425 - 435 (1969)
- Tandler, C. J.: Oxalic acid and potassium in *Acetabularia*. *Naturwiss.* 49, 112 (1962)
- Teague, W. M. and H. R. Henney: Purification and properties of cytoplasmic and mitochondrial malate dehydrogenase of *Physarum polycephalum*. *J. Bacteriol.* 116, 673 - 684 (1973)
- Ting, I. P.: Malic dehydrogenase in Corn root tips. *Arch. Biochem. Biophys.* 126, 1 - 7 (1968)
- Ting, I. P. and V. Rocha: NADP-specific malate dehydrogenase of green Spinach leaf tissue. *Arch. Biochem. Biophys.* 147, 156 - 164 (1971)

- Tolbert, N. E.: Leaf peroxisomes and photorespiration.
In: Hatch, M. D. et al.: Photosynthesis and photorespiration. p. 458 - 471 (1971)
- Tolbert, N. E., A. Oeser, T. Kisaki, R. H. Hageman,
and R. K. Yamazaki: Peroxisomes from Spinach leaves
containing enzymes related to glycolate metabolism.
J. Biol. Chem. 243, 5179 - 5184 (1968)
- Ursprung, H. and L. Carlin: Ann. N. Y. Acad. Sci. 151,
456 - 475 (1968)
- Van Gansen, P. and M. Boloukhère-Presburg: Ultrastructure de l'algue unicellulaire *Acetabularia mediterranea*. J. Microscop. 4, 347 - 362 (1965)
- Vettermann, W.: Mechanism of the light-dependent accumulation of starch in chloroplasts of *Acetabularia* and its regulation. Protoplasma 76, 261 - 278 (1973)
- Weimberg, R.: An electrophoretic analysis of the isoenzymes of malate dehydrogenase in different plants. Plant Physiol. 43, 622 - 628 (1968)
- Werz, G.: Über polare Plasmaunterschiede bei *Acetabularia*. Planta 53, 502 - 521 (1959)
- Werz, G.: Über die Wirkung von Dunkelheit auf den Proteingehalt kernhaltiger und kernloser Zellteile von *Acetabularia mediterranea*. Z. Naturforsch. 15b, 85 - 90 (1960)
- Werz, G.: Untersuchungen zur Feinstruktur des Zellkernes und des perinucleären Plasmas von *Acetabularia*. Planta 62, 255 - 271 (1964)
- Werz, G.: Determination and realization of morphogenesis in *Acetabularia*. Brookhaven Symp. Biol. 18,

185 - 203 (1965)

Werz, G.: Morphologische Veränderungen in Chloroplasten und Mitochondrien von verdunkelten *Acetabularia*-Zellen. *Planta* 68, 256 - 268 (1966)

Werz, G.: Cytoplasmic control of cell wall formation in *Acetabularia*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 51, 27 - 62 (1970)

Werz, G.: Fine-structural aspects of morphogenesis in *Acetabularia*. *Int. Rev. Cytol.* 38, 319 - 367 (1974)

Wharton, D. C. and A. Tzagoloff: Cytochromoxydase from beef heart mitochondria. In: R. W. Estabrook and M. E. Pullman *Meth. Enzymol.* X, S. 245 - 250 (1967)

Winkenbach, F., M. V. Parthasarathy, and R. G. S. Bidwell: Sites of photosynthetic metabolism in cells and chloroplast preparations of *Acetabularia mediterranea*. *Can. J. Bot.* 50, 1367 - 1375 (1972)

Witt, I., R. Kronau und H. Holzner: Isoenzyme der Malatdehydrogenase und ihre Regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 128, 63 - 73 (1966)

Woodcock, C. L. F. and L. Bogorad: Nucleic acids and information processing in chloroplasts. In: M. Gibbs *Structure and function of chloroplasts*. Springer Verl. S. 89 - 128 (1971)

Yamazaki, R. K. and N. E. Tolbert: Malate dehydrogenase in leaf peroxisomes. *Biochim. Biophys. Acta* 178, 11 - 20 (1969)

Yang, N. S. and J. G. Scandalios: Purification and biochemical properties of genetically defined malate

dehydrogenase in Maize. Arch. Biochem. Biophys.

161, 335 - 353 (1974)

Yang, N. S. and J. G. Scandalios: De novo synthesis
and developmental control of the multiple gene-control-
led malate dehydrogenase isozymes in Maize scutella.

Biochim. Biophys. Acta 384, 293 - 306 (1975)

Zerban, H.: Verhalten von Struktur und Funktion der
Dictyosomen bei Acetabularia unter verschiedenen
experimentellen Bedingungen. Diss., Freie Universi-
tät Berlin (1974)

Zschoche, W. C. and I. P. Ting: Purification and proper-
ties of microbody malate dehydrogenase from Spina-
cia oleracea leaf tissue. Arch. Biochem. Biophys.

159, 767 - 776 (1973)

7. Verzeichnis der Abkürzungen

DEAE-Cellulose	=	Diäthylaminoäthyl-Cellulose
DTT	=	Dithioerythrit
EDTA	=	Äthylendiamintetraessigsäure
h	=	Stunden
MDH	=	Malatdehydrogenase
MES	=	Morpholinoäthansulfonsäure
mS	=	milliSiemens
NAD	=	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADH	=	reduziertes Nicotinamid-adenin- dinucleotid
NADPH	=	reduziertes Nicotinamid-adenin- dinucleotidphosphat
pps	=	Pulse pro Sekunde
p.s.i.	=	pound per square inch
RSA	=	Rinderserumalbumin

Lebenslauf

Name:	Ursula Rahmsdorf, geb. Schael
Geburtstag:	8. Mai 1938
Geburtsort:	Pitschen, Kreis Kreuzburg (Oberschlesien)
Heirat:	5. November 1974 mit Hans Jobst Rahmsdorf in Berlin
Herbst 1945 - Juli 1948:	Arndt-Schule in Luckenwalde
August 1948 - Juli 1950:	Friedrich-Ebert-Schule in Luckenwalde
August 1950 - Juni 1951:	8./20. Volksschule in Berlin- Charlottenburg
Juli 1951 - März 1957:	Ricarda-Huch-Schule in Berlin- Charlottenburg
April 1957 - März 1959:	Marie-Curie-Schule in Berlin- Wilmerdsdorf
SS 1959 - WS 1965/66:	Freie Universität Berlin, Studium der Biologie
April 1966:	Diplom in Biologie Thema der Arbeit: Das Ver- halten von vier Acetabulariaar- ten im Rot- und Blaulicht unter besonderer Berücksichtigung der Photosynthese Anleitung: Prof. Dr. H. Clauss

1. Sept. 1966 - 31. Dez. 1967:

wissenschaftliche Assis-
tentin an der Bundesan-
stalt für Fleischforschung
in Kulmbach

1. Jan. 1968 - 30. Sept. 1970:

wissenschaftliche Assis-
tentin am Max-Planck-Insti-
tut für Zellbiologie in
Wilhelmshaven

1. Okt. 1970 - 30. Sept. 1975:

wissenschaftliche Assis-
tentin in der Abteilung
für Feinstrukturforschung
und Elektronenmikroskopie
am Institut für Pflanzen-
physiologie und Zellbiologie
der Freien Universität
Berlin

